

**CARACTERIZACIÓN DE POLIFENOLES Y SU
ACCIÓN SOBRE SIRTUÍNAS EN MODELOS DE
INFLAMACIÓN INTESTINAL Y CÁNCER**

**Tesis Doctoral presentada por
Antonio Javier Alcaide Molina**

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1. POLIFENOLES | 3 |
| 1.1. Clasificación | 3 |
| 1.2. Biodisponibilidad | 6 |
| 2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL | 7 |
| 2.1. Patogenia | 8 |
| 2.1.2. Factores genéticos | 9 |
| 2.1.2. Factores ambientales | 10 |
| 2.1.3. Factores psicosociales | 11 |
| 2.1.4. Factores microbiológicos | 11 |
| 2.1.5. Factores inmunológicos | 12 |
| 2.2. Tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal | 14 |
| 2.2.1. Tratamiento farmacológico | 14 |
| 2.2.2. Terapia biológica | 16 |
| 2.2.3. Modulación flora intestinal | 18 |
| 2.2.4. Tratamiento quirúrgico | 18 |
| 2.2.5. Terapia nutricional | 19 |
| 2.3. Modelos animales de inflamación intestinal | 20 |
| 3. CÁNCER DE COLON | 21 |
| 3.1. Etiopatología | 21 |
| 3.2. Prevención | 23 |
| 4. PAPEL DE LOS POLIFENOLES | 24 |
| 4.1. Efecto antioxidante | 24 |
| 4.2. Actividad antiinflamatoria | 25 |
| 4.3. Inducción de la detención del ciclo celular | 26 |
| 4.4. Apoptosis | 26 |
| 4.5. Actividad anticáncer | 27 |
| 4.6. Efectos antiangiogénicos y antimetastático | 28 |
| 4.7. Efectos antiproliferativos | 28 |

| | |
|--|-----------|
| 4.8. Efectos en el cáncer de colon | 28 |
| 5. SIRTUÍNAS | 30 |
| 5.1. Polifenoles como activadores de sirtuínas | 32 |
| 5.2. Relación sirtuínas/AMPK/autofagia | 33 |
| 6. <i>CAENORHABDITIS ELEGANS</i> | 35 |
| 6.1. Características biológicas | 35 |
| 6.2. Ciclo de vida | 36 |
| 6.3. Sexo | 37 |
| 6.4. Anatomía | 38 |
| 6.5. <i>C. elegans</i> como organismo modelo en estudios con polifenoles | 38 |
| 6.6. Sirtuínas de <i>C. elegans</i> | 39 |
| II. OBJETIVOS | 41 |
| II. OBJECTIVES | 45 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 49 |
| 1. MATERIAL BIOÓGICO | 51 |
| 1.1. Líneas celulares | 51 |
| 1.2.1. Línea celular de adenocarcinoma de colon humano, HT-29 | 51 |
| 1.2.2. Línea celular monocitaria de leucemia aguda humana, THP-1 | 51 |
| 1.2. Animales de experimentación | 51 |
| 1.2.1. Ratones C57BL/6 | 51 |
| 1.2.2. <i>Caenorhabditis elegans</i> | 52 |
| 2. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> | 52 |
| 2.1. Sustancias ensayadas | 52 |
| 2.2. Citotoxicidad mediante el ensayo de la sulforodamina B | 52 |
| 2.3. Expresión de proteínas mediante <i>Western Blot</i> | 53 |
| 2.4. Producción del factor de necrosis tumoral α mediante ELISA | 54 |

| | |
|---|----|
| 3. ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> | 54 |
| 3.1. Modelo murino de inflamación crónica que deriva a cáncer de colon | 54 |
| 3.1.1. Evaluación macroscópica e histopatológica | 55 |
| 3.1.2. Evaluación inmunohistoquímica | 56 |
| 3.1.3. Estudio de la expresión de proteínas mediante <i>Western Blot</i> | 56 |
| 3.1.4. Extracción de ARN | 57 |
| 3.1.5. Reacción de la transcriptasa inversa | 57 |
| 3.1.6. Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real | 58 |
| 3.2. Modelo murino de colitis ulcerosa aguda inducida por dextrano sulfato sódico | 59 |
| 3.2.1. Sustancias ensayadas, dosis y vía de administración | 59 |
| 3.2.2. Inducción de la colitis ulcerosa aguda | 60 |
| 3.2.3. Evaluación macroscópica e histopatológica | 60 |
| 3.2.4. Actividad de la enzima mieloperoxidasa | 60 |
| 3.2.5. Producción de citocinas mediante ELISA | 61 |
| 3.2.6. Expresión de proteínas mediante <i>Western Blot</i> | 62 |
| 3.3. Modelo basado en el nematodo <i>Caenorhabditis elegans</i> para estudios de respuestas vitales y de expresión génica | 62 |
| 3.3.1. Cepas empleadas | 62 |
| 3.3.2. Sustancias ensayadas | 62 |
| 3.3.3. Preparación de placas de agar | 63 |
| 3.3.4. Preparación del medio de crecimiento para bacteria <i>Escherichia coli</i> y sembrado de placas | 63 |
| 3.3.5. Transferencia de gusanos entre placas | 63 |
| 3.3.6. Sincronización de la población de gusanos | 64 |
| 3.3.7. Cuantificación de triglicéridos | 64 |
| 3.3.8. Extracción de ARN | 65 |
| 3.3.9. Reacción de la transcriptasa inversa | 66 |

| | |
|---|----|
| 3.3.10. Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real | 66 |
| 3.3.11. Ensayos de longevidad | 66 |
| 3.3.12. Ensayos de longitud del cuerpo | 67 |
| 3.3.13. Ensayos de bombeo faríngeo | 68 |
| 4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 68 |
| IV. RESULTADOS | 71 |
| 1. ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> | 71 |
| 1.1. Citotoxicidad de polifenoles y extractos | 71 |
| 1.2. Estudio de la expresión de sirtuína 1 | 71 |
| 1.3. Estudio de la producción del factor de necrosis tumoral- α | 72 |
| 2. MODELO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA QUE DERIVA A CÁNCER DE COLON | 73 |
| 2.1. Valoración macroscópica de la colitis | 73 |
| 2.2. Estudios histológico del daño colónico | 75 |
| 2.3. Estudio inmunohistoquímico del antígeno nuclear de proliferación celular | 77 |
| 2.4. Expresión génica del factor de necrosis tumoral- α y de sirtuína 1 | 79 |
| 2.5. Evaluación de la inducción de la autofagia y papel de la proteína cinasa activada por AMP | 80 |
| 3. MODELO DE COLITIS ULCEROSA AGUDA INDUCIDA POR DEXTRANO SULFATO SÓDICO | 83 |
| 3.1. Valoración macroscópica de la colitis | 83 |
| 3.2. Estudio histológico del daño colónico | 84 |
| 3.3. Análisis bioquímico de la mucosa colónica | 86 |
| 3.3.1. Actividad de la enzima mieloperoxidasa | 86 |
| 3.3.2. Producción de las citocinas factor de necrosis tumoral- α e interleucina 6 | 86 |
| 3.3.3. Expresión proteica de la ciclooxigenasa-2, la sirtuína 2 y la proteína cinasa activada por AMP fosforilada | 88 |
| 4. ESTUDIO DE DIFERENTES POLIFENOLES EN EL MODELO DE CAENORHABDITIS ELEGANS | 91 |

| | |
|---|------------|
| 4.1. Efecto de la metformina sobre los gusanos mutantes <i>ire-1</i> | 91 |
| 4.2. Efecto de la metformina en la expresión génica de las lipasas FIL-1 y FIL-2 (<i>Fasting Induced Lipase</i>) en los gusanos mutantes <i>ire-1</i> | 92 |
| 4.3. Efecto de la metformina en la expresión génica de sirtuína en los gusanos mutantes <i>ire-1</i> | 93 |
| 4.4. Efecto de la metformina en la expresión génica de <i>aak1</i> en los gusanos mutantes <i>ire-1</i> | 94 |
| 4.5. Efecto de la metformina en la expresión génica de sirtuína en los gusanos mutantes <i>aak2</i> | 94 |
| 4.6. Efecto del resveratrol en la acumulación de triglicéridos y la expresión génica de las lipasas FIL-1 y FIL-2 | 95 |
| 4.7. Efecto del extracto de hoja de mango en <i>C. elegans</i> | 97 |
| V. DISCUSIÓN | 100 |
| VI. CONCLUSIONES | 111 |
| VI. CONCLUSIONS | 115 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 119 |

RESUMEN

Título: “Caracterización de polifenoles y su acción sobre sirtuínas en modelos de inflamación intestinal y cáncer”

Autor: Antonio Javier Alcaide Molina.

Resumen:

El estudio de los productos procedentes de la naturaleza, ya sean de plantas, animales invertebrados, o microorganismos, continúa siendo en la actualidad uno de los procedimientos más consistentes para el descubrimiento de nuevos compuestos que puedan dar lugar al desarrollo de fármacos. En este sentido, es interesante señalar que aproximadamente la mitad de los nuevos medicamentos introducidos entre 1981 y 2006 son derivados de productos naturales.

De entre todos ellos, los polifenoles son uno de los grupos más estudiados; no obstante, las investigaciones con nuevas especies vegetales, los ensayos con extractos polifenólicos, así como la búsqueda de derivados con interés farmacológico está en claro desarrollo. Se tratan de metabolitos secundarios de plantas involucrados generalmente en los mecanismos de defensa frente agresiones externas. Con más de 8.000 variantes estructurales, la base estructural común es la presencia de uno o varios anillos fenólicos.

La actividad antirradicales libres de los polifenoles está ampliamente descrita, constituyendo los antioxidantes más potentes presentes en nuestra dieta. Sin embargo se siguen investigando nuevas propiedades y en este sentido destaca la actividad antiinflamatoria.

La inflamación es una reacción de la microcirculación que se caracteriza por la migración de las proteínas del suero y los leucocitos de la sangre al tejido extravascular. Esta migración se regula por la liberación secuencial de mediadores vasoactivos y quimiotácticos, tales como histamina, 5-OH-triptamina, moléculas de adhesión, y citocinas tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), o las interleucinas 1, 6, 8 y 10. Estos procesos se acompañan de un aumento de la temperatura local, enrojecimiento, hinchazón, dolor, y pérdida de la función del tejido, y a nivel celular los mecanismos de regulación son complejos involucrando a diversas vías de señalización.

Son de gran interés las evidencias sobre las múltiples asociaciones entre las enfermedades inflamatorias crónicas y diferentes tipos de neoplasias; entre ellas están las que implican a la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y evolución hacia el cáncer de colon. La EII es un término utilizado para definir a un grupo de trastornos inflamatorios intestinales crónicos, afectando principalmente al intestino grueso, de etiología desconocida. Dentro de este grupo de trastornos están incluidas la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Ambas patologías se caracterizan por la aparición de una inflamación aguda recurrente de segmentos del intestino delgado y/o colon, con manifestaciones clínicas tanto intestinales como extraintestinales, que con frecuencia presentan recidivas.

Resumen

Las sirtuínas son histonas desacetilasas tipo III, ampliamente distribuidas en la naturaleza, con demostradas implicaciones en procesos como la inflamación, la senescencia celular, la diferenciación celular o el metabolismo. Su mecanismo de regulación se debe a su capacidad de desacetilar tanto histonas como proteínas no histonas. Existen numerosos estudios que muestran cómo el aumento de polifenoles en la dieta protege frente a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias y metabólicas, y se está discutiendo su papel en algunos procesos cancerosos, siempre consecuencia de la actividad desacetilasa de las sirtuínas. El resveratrol fue el primer compuesto polifenólico que demostró activar la SIRT1, y ya se han descrito derivados que son hasta 800 veces más eficaces. La modulación de sirtuínas a través de otros reguladores, como la proteína cinasa activada por AMP (AMPK), es un campo de gran debate y estudio; además se está analizando la participación de ambas proteínas en la regulación del proceso de autofagia.

En las investigaciones relacionadas con nuestro proyecto de tesis se ha estudiado la actividad biológica de algunos compuestos polifenólicos y su relación con las sirtuínas. Se han ensayado tanto compuestos puros (resveratrol y quercetina) como extractos enriquecidos en polifenoles (hojas de mango, hojas de uva), realizando estudios *in vitro* e *in vivo*. Concretamente:

- Hemos valorado la actividad citotóxica en dos líneas celulares, la línea de leucemia monocitaria aguda humana (THP-1) y otra de adenocarcinoma de colon humano (HT-29). Si bien ninguno de los compuestos mostró actividad citotóxica con las diferentes dosis ensayadas, sí mostraron una reducción significativa en la producción de TNF- α en macrófagos THP-1 estimulados con lipopolisacárido bacteriano. Además, la expresión de SIRT1 se vio incrementada de manera significativa tras la exposición a los compuestos polifenólicos.

- El primer estudio *in vivo* se han realizado con ratones deficientes en interleucina 10 (IL-10). Estos ratones *knockouts* se caracterizan por desarrollar de manera espontánea colitis inflamatoria que, a medida que la enfermedad avanza, puede derivar en cáncer de colon. La evaluación del proceso se ha realizado examinando y sacrificando ordenadamente los ratones a distintas edades, entre las 6 y las 18 semanas. Los resultados confirmaron que los animales deficientes en IL-10 desarrollaron una colitis inflamatoria a partir de la 6ª semana, cuya gravedad aumentó progresivamente a medida que la edad de los mismos avanzaba. En este sentido, los animales presentaron lesiones displásicas a partir de las 10 semanas, hallándose cierta correlación entre la gravedad de las lesiones y el proceso inflamatorio previo (escala). Además, se analizó la expresión colónica de SIRT1, presentando una marcada reducción en todos los grupos de animales KO para IL-10. Los resultados de este estudio también mostraron una activación de la autofagia en todos los grupos de ratones deficientes en IL-10, evidenciada por la acumulación de la proteína LC3-II, el incremento en la expresión de Beclin 1 y la disminución de los niveles de Bcl-2.

- El segundo estudio *in vivo* consistió en evaluar el efecto de un extracto de hojas de mango, conteniendo un 60% de manguiferina, en un modelo agudo de colitis ulcerosa por administración de dextranosulfato sódico al 3% en el agua de bebida durante 7 días. Se emplearon distintos grupos entre los que se encontraba uno que recibió un tratamiento con resveratrol (50 mg/kg), como polifenol de referencia, y otros dos grupos de animales que recibieron el extracto de mango, a las dosis de 50 y 100 mg/kg. Los resultados mostraron que tanto el resveratrol como el extracto de hoja de mango podrían aliviar efectivamente la colitis, con incremento notable en la producción de moco, e inhibición de la infiltración neutrofílica y de mediadores inflamatorios incluyendo las citocinas TNF- α e IL-6, y la enzima COX-2. Además, los ratones tratados con resveratrol o el extracto de hoja de mango experimentaron un marcado incremento en la expresión de SIRT1 y pAMPK. Estos hallazgos sugieren que un papel destacado de los compuestos polifenólicos como estrategia terapéutica para el tratamiento de la fase activa de la colitis.

- Con el fin de profundizar en el estudio de los efectos de los polifenoles como reguladores de sirtuínas, se realizaron nuevos ensayos con el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Este organismo es un modelo muy empleado desde los años 70, sobre todo en estudios genéticos. El conocimiento actual de su genoma permite la elaboración de mutantes a la carta. Aunque en farmacología no es un modelo muy extendido, nos propusimos su empleo para detectar, además de los efectos sobre las sirtuínas, otras actividades que pudieran estar relacionadas.

Uno de los mutantes utilizados para estos ensayos fue el mutante para el gen *ire-1* (*inositol requiring enzyme 1*) que presentaba un mayor acúmulo de triglicéridos. La administración de metformina (100 mM), fármaco activador de AMPK, consiguió reducir la cantidad de triglicéridos acumulados en el interior del gusano, tanto en el mutante obeso como en los gusanos *wild type* (N2). Con el objeto de estudiar los posibles mecanismos por los cuales la metformina es capaz de revertir el “fenotipo obeso”, se determinó la expresión de las lipasas FIL-1 y FIL-2 (del inglés *fasting-induced lipase*), activadas por *ire1*, así como los niveles de *sir2.1*, que es la sirtuína principal en *C. elegans*. Nuestros hallazgos sugieren que la metformina reduce la acumulación de triglicéridos a través del aumento en la expresión de las lipasas FIL-1 y FIL-2 en el fenotipo obeso, así como el incremento en los niveles de *sir2.1* tanto en los gusanos *wild type* como en los mutantes obesos. El siguiente paso fue ensayar el efecto del resveratrol en la acumulación de triglicéridos en la cepa silvestre y en un mutante que no expresaba sirtuínas, el mutante *sir2.1*. El tratamiento de los gusanos con resveratrol (100 μ M) mimetizó los efectos de la metformina, consiguiendo reducir el contenido de triglicéridos en los gusanos N2. Sin embargo, estos efectos desaparecieron al emplear el mutante *sir2.1*, ya que tras la administración del resveratrol o la metformina se pudo comprobar que este gusano no adelgazaba. Al igual que la metformina, el resveratrol no consiguió incrementar los niveles de las lipasas FIL-1 y FIL-2 en ninguna de las dos cepas. Estos resultados sugieren que el efecto adelgazante del resveratrol, al igual que la metformina, es dependiente de sirtuínas.

Resumen

Finalmente, se evaluó el efecto del extracto de hojas de mango sobre la longevidad del nematodo, en base a los estudios previos que demostraban que el resveratrol incrementaba este parámetro. En este sentido, los datos actuales sobre el incremento de longevidad mediante activadores de sirtuínas son muy discutidos. Nuestros resultados mostraron que el extracto de hojas de mango, a las concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$ no conseguía aumentar significativamente los días de vida del nematodo, aunque sí lograba que los gusanos tuvieran una vida media ligeramente mayor. La “teoría del soma” propone que el incremento de longevidad puede conseguirse, entre otros, por la reducción del tamaño, o por la restricción calórica. El tratamiento con el extracto de hoja de mango produjo cambios significativos en la longitud de los gusanos y en la ingesta de alimento (parámetro que está directamente relacionado con la restricción calórica) en la cepa N2 pero no así en la cepa *sir2.1*, por lo que el aumento de longevidad de los gusanos que recibieron el extracto parece dependiente de sirtuínas. Aun así se necesitan más estudios que relacionen de forma directa la estimulación de sirtuínas con el incremento de longevidad.

En conclusión, tanto los estudios *in vitro* como los realizados *in vivo* demuestran los efectos beneficiosos de los polifenoles en inflamación con mecanismos que implican a la enzima SIRT1 como elemento clave de regulación de diferentes vías relacionadas.

SUMMARY

Title: "Characterization of polyphenols and their action on sirtuins in inflammation and cancer intestinal "

Author: Antonio Javier Alcaide Molina

Abstract:

The study of natural products, derived from plants, invertebrate animals or microorganisms, remains today one of the most promising field for the discovery of new compounds that may lead to drugs development. In this regard, it is interesting to point out that about half of the new drugs introduced between 1981 and 2006 are derived from natural products.

Polyphenols are one of the most studied groups; however, research with new plant species, trials with polyphenolic extracts and derivatives to search pharmacological interest is still in development. Polyphenols are plant secondary metabolites generally involved in defense mechanisms against external aggression. Over 8,000 structural variants are known, being the common structural base the presence of one or more phenolic rings.

The anti-free radical activity of polyphenols is widely described; in fact, they are the most potent antioxidants in our diet. However, the investigation of new properties still continues, and in this regard, the antiinflammatory activity is one of the most important.

Inflammation is a reaction of the microcirculation that is characterized by migration of serum proteins and blood leukocytes into the extravascular tissue. This migration is regulated by the sequential release of vasoactive and chemotactic mediators, such as histamine, 5-OH-tryptamine, adhesion molecules and cytokines, such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), or interleukins 1, 6, 8 and 10. These processes are accompanied by an increase in local temperature, redness, swelling, pain, and loss of tissue function, and at the cellular level there are several signaling pathways involved.

There are evidences about the multiple associations between chronic inflammatory diseases and different types of neoplasia; among them, the relation between inflammatory bowel disease (IBD) and its progression to colon cancer is well known. IBD, including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are chronic intestinal inflammatory disorders, mainly affecting the large intestine of unknown etiology. These diseases are characterized by the appearance of recurrent acute inflammation of the small intestine segments and / or colon, with both intestinal and extraintestinal clinical manifestations.

Sirtuin proteins are histone deacetylase type III, widely distributed in nature, with demonstrated implications in processes such as inflammation, cell senescence, cell differentiation or metabolism. They can deacetylate histones and other proteins. There are numerous studies that show how the increase of dietary polyphenols protects against neurodegenerative, cardiovascular, inflammatory and metabolic diseases and cancer,

Summary

always following the deacetylase activity of sirtuins. Resveratrol was the first polyphenolic compound that was shown to activate SIRT1, and currently, there are derivatives that have been described to be up to 800 times more effective. The modulation of sirtuins by other regulators, such as AMP-activated protein kinase (AMPK), as well as the study of the participation of both proteins in the regulation of autophagy process is still in study.

In our researchs, we studied the biological activity of some polyphenolic compounds and their relationship with sirtuins. We tested both pure compounds (resveratrol and quercetin) and extracts enriched in polyphenols (mango leaves and grape leaves), performing *in vitro* and *in vivo* studies; specifically:

- We assessed the cytotoxic activity of the compounds on two cell lines, a human monocytic cell line derived from an acute monocytic leukemia patient (THP-1) and a human colon adenocarcinoma line (HT-29). Although none of the compounds showed cytotoxic activity with the different doses tested, they showed a significant reduction in the production of TNF- α in bacterial lipopolysaccharide-stimulated THP-1 macrophages. Furthermore, SIRT1 expression was significantly increased after exposure to the polyphenolic compounds.

- The first *in vivo* study has been performed with mice deficient in interleukin 10 (IL-10). These knockout mice have defects in immune regulation and spontaneously develop chronic enterocolitis. It has also been reported that, with age, IL-10^{-/-} mice develop adenocarcinoma through the dysplasia sequence, a process similar to clinical IBD-associated cancer. In order to evaluate the damage progression over time, knockout mice between 6 and 18 weeks of age were examined. Our findings showed that IL-10-deficient mice developed colitis from the age of 6 weeks onward. The severity of inflammation and dysplasia as well as the proliferative activity increased gradually with age. IL-10^{-/-} mice were also characterized by improved levels of TNF- α mRNA and decreased expression of SIRT1 mRNA, compared to wild-type (WT) mice. Moreover, our findings show an increase in phosphorylated AMPK (pAMPK) expression and an activation of the autophagy in IL-10^{-/-} mice from all stages compared to WT animals, evidenced by the accumulation of LC3-II protein, the increase in Beclin 1 expression and the reduction in Bcl-2 colonic levels. Our results suggest that the SIRT1-AMPK-autophagy pathway is involved in the maintenance of chronic inflammation and dysplasia development in the IL-10-deficient mice model. Modulation of this pathway could be a novel strategy for IBD and CRC treatment.

- The second *in vivo* study aimed to evaluate the effect of a mango leaf extract, containing a 60% of mangiferin, on an acute model of ulcerative colitis induced by administration of dextran sulfate sodium at 3% in the drinking water for 7 days. A group received resveratrol treatment (50mg/kg), as reference polyphenol, and other two groups of animals received the mango leaf extract at the doses of 50 and 100 mg/kg. The results showed that, both resveratrol and mango leaf extract, effectively attenuated

acute colitis, with remarkable enhance in mucus production, and inhibition of neutrophil infiltration as well as inflammatory mediators, including TNF- α and IL-6 cytokines, and COX-2 enzyme. Furthermore, mice treated with resveratrol or mango leaf extract showed a significant increase in the expression of SIRT1 and pAMPK. These findings suggest an important role of these polyphenolic compounds as therapeutic strategy for the treatment of the active phase of colitis.

- To further study of effect of polyphenols as regulators of sirtuins, we performed some experiments using the nematode *Caenorhabditis elegans*. This organism is a widely used model from the 70s, especially in genetic studies. Current knowledge of its genome allows the development of selected mutants. Although *C. elegans* is not very used for pharmacological studies, we proposed its use to detect, in addition to the effects on sirtuins, other activities that might be related.

One of the strain used for these assays was the mutant for *ire-1* gene (inositol requiring enzyme 1), which have high levels of triglycerides. The administration of metformin (100 mM), an AMPK activator drug, was able to reduce triglyceride accumulation, assessed by Oil-Red-O staining, in both obese mutants and wild-type worms (N2). In order to study the possible mechanism by which metformin may reverse the “obese phenotype”, the expression of the two lipases activated by *ire-1*, FIL-1 and FIL-2 (fasting-induced lipase), as well as *sir2.1* (the main sirtuin in *C. elegans*) levels were determined. Our findings suggest that metformin reduces fat accumulation through increased expression of FIL-1 and FIL-2 in the obese phenotype, as well as enhanced levels of *sir2.1* in both wild-type worms and obese mutants. The next step was to test the effect of resveratrol on the accumulation of triglycerides in the wild strain and in a mutant that not expressed sirtuins, the *sir2.1* mutant. The effect detected after resveratrol administration (100 μ M) was similar to that found with metformin treatment, reducing the content of triglycerides in N2 worms. However, this effect disappeared in the *sir2.1* strain after administration of resveratrol or metformin. Like metformin, resveratrol failed to increase the levels of FIL-1 and FIL-2 in neither strain. These results suggest that the anti-obesity effect of resveratrol, like metformin, is dependent on sirtuins.

Finally, the effect of the mango leaf extract on the longevity of the nematode was evaluated, based on previous studies showing that resveratrol increased this parameter. In this sense, the current data on the increase in longevity by activating sirtuins are discussed. Our results showed that the extract, at concentrations of 50 and 200 μ g/mL was not able to increase significantly the lifespan, although the worms have a slightly longer half-life. This effect disappeared in the strain *sir2.1*. The *soma theory* proposes that the increase in longevity can be achieved by reducing the size or by caloric restriction, among others. Treatment with the mango extract induced significant changes in the length of the worms and in the food intake (parameter that is directly related to caloric restriction) in the wild type worms but, again, this effects disappeared

Summary

in *sir2.1* worms. Further studies are required to relate directly sirtuins stimulation with the increase in longevity.

In conclusion, our *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the beneficial effects of polyphenols in inflammation, with mechanisms involving sirtuins as a key enzyme regulating different signaling pathways.

INTRODUCCIÓN

1. POLIFENOLES

Los polifenoles son los antioxidantes más abundantes en nuestra dieta encontrándose de manera generalizada en las frutas, las verduras, los cereales, el aceite de oliva, las legumbres secas, el chocolate y hasta en bebidas, como el té, el café y el vino. Algunos polifenoles son específicos de determinados alimentos (flavononas en cítricos), y otros, como la quercetina, se pueden encontrar en un gran número de plantas. Generalmente los alimentos contienen una mezcla compleja de polifenoles. Además, numerosos factores medioambientales como la luz, el grado de madurez o el grado de conservación, pueden afectar al contenido total de polifenoles, además del procesado de los alimentos (Rothwell y col., 2014). Estas moléculas son metabolitos secundarios de plantas, y por lo general están involucrados en el mecanismo de defensa dadas sus características antibióticas y antifúngicas (Leiro y col., 2004) aunque algunos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales (Yoon y Baek, 2005). Con más de 8000 variantes estructurales, su característica estructural general es la presencia de anillos aromáticos, con uno o más restos hidroxilo.

1.1. Clasificación

Los polifenoles se dividen en varias clases de acuerdo con el número de anillos fenólicos que contienen y a los elementos estructurales que se unen entre ellos. Se puede establecer 6 grandes grupos: ácidos fenólicos (derivados del ácido hidroxibenzoico o del ácido hidroxicinámico), estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides.

Ácidos fenólicos

Son compuestos polifenólicos no flavonoides que se pueden dividir en dos tipos principales, derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Si bien las frutas y verduras contienen muchos ácidos fenólicos libres, en granos y semillas se encuentran son a menudo en la forma unida (Chandrasekara y Shahidi, 2010). Estos ácidos fenólicos sólo pueden ser liberados o hidrolizados por hidrólisis ácida o alcalina, o por enzimas. (Tsao, 2010).

Los ácidos hidroxibenzoicos, como el ácido gálico o el ácido protocatéquico, no tienen especial interés nutricional pues se encuentran en pocas plantas consumidas por los seres humanos, además de encontrarse en baja cantidad a excepción de ciertas frutas rojas como las moras. La hoja de té es quizás la fuente más importante de ácido gálico, pudiendo contener hasta 4.5 g/kg de peso fresco, además de ser un compuesto que se absorbe bastante bien en comparación con otros polifenoles.

Los ácidos hidroxicinámicos no suelen encontrarse en forma libre encontrándose esterificados en la pared celular vegetal, y por lo tanto, poseen una baja solubilidad. Los principales representantes son el ácido ferúlico, el ácido cumárico y el ácido cafeico. El ácido clorogénico se forma por la combinación del ácido cafeico y el ácido quínico, está presente en muchos tipos de frutas y en gran cantidad en el café (una taza de café puede tener hasta 350 mg de ácido clorogénico (Clifford y col., 2007).

Estilbenos

Introducción

Los estilbenos suelen estar presente en cantidades bajas en la dieta humana. Sin duda alguna el principal representante es el resveratrol, producido por las plantas en respuesta a la infección por patógenos o ante situaciones de estrés (Delmas y col., 2006). El resveratrol está presente en más de 70 especies de plantas, entre las que se encuentran las uvas, las bayas y los cacahuets. La piel de las uvas rojas es especialmente rica en resveratrol lo que propicia los altos niveles de resveratrol en el vino tinto (0.59 mg/L) (Agatonovic-Kustrin y col., 2015). La producción sintética de resveratrol es posible, además de derivados con actividades mucho más alta (Pezzuto y col., 2013). De entre las actividades descritas del resveratrol destacan su poder antioxidante y antiinflamatorio. Desde hace algunos años se le han atribuido propiedades antienvjecimiento y de alargar la vida en organismos como *Drosophila melanogaster* o el nematodo *Caenorhabditis elegans*, sin embargo en 2011 se desmintieron en *Nature* gran parte de esos resultados (Burnett y col., 2011).

Lignanos

Están compuestos por 2 unidades de fenilpropano unidos en posición β - β' . Están presentes generalmente en forma libre, aunque también existen derivados glicósidos. La semilla del lino es la principal fuente dietética, pudiendo llegar hasta los 3.7 g/kg de peso seco de secoisolariciresinol según la variedad (Adlercreutz y Mazur, 1997). La microflora intestinal metaboliza los lignanos a metabolitos como enterodiol y enterolactona.

El interés en los lignanos y sus derivados sintéticos está aumentando debido a posibles aplicaciones. Se ha descrito que el pinoresinol del aceite de oliva posee propiedades de quimiopreención *in vitro* (Fini y col., 2008). Otros efectos descritos incluyen la protección frente al síndrome metabólico o la reducción de fenómenos como la angiogénesis (Adolphe y col., 2010) además de la lógica actividad antioxidante típica de los polifenoles.

Alcoholes fenólicos

Tirosol (4-hidroxifeniletanol) e hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol) son los principales alcoholes fenólicos, presentes principalmente en el aceite de oliva virgen extra (40,2 y 3,8 mg/kg, respectivamente) (Cabrini y col., 2001). La concentración de fenoles totales en el aceite de oliva virgen extra tiene un valor medio de aceite de oliva comercial de aproximadamente 180 mg/kg (Owen y col., 2000), y que dependerá de la variedad, el clima, área de crecimiento y la madurez de la aceituna además del proceso de extracción (Volpe y col., 2014).

Además de en el aceite de oliva virgen extra el tirosol se encuentra en los vinos tintos y blancos y en la cerveza, mientras que el hidroxitirosol solo está presente en el vino tinto (Covas y col., 2003).

Aunque la actividad antioxidante del tirosol no es tan potente como otros compuestos presentes en el aceite de oliva, su concentración más elevada y buena biodisponibilidad indica que puede tener un importante efecto general (Miro-Casas y col., 2003). Además se han descrito actividad protectora frente a la colitis producida en ratones por dextrán *sulfato* sódico (Sanchez-Fidalgo y col., 2013).

Flavonoides

Los flavonoides tienen una estructura general C₆-C₃-C₆ en el que las dos unidades C₆ del anillo A y el anillo B son de naturaleza fenólica (**Figura 1**). La mayoría de estos compuestos existen como glicósidos, es por ello que las actividades biológicas de estos compuestos dependen tanto de la diferencia estructural como de los patrones de glicosilación. Pueden localizarse en distintas zonas de la planta, aunque principalmente aparecen en las partes aéreas.

Figura 1. Estructura general de los flavonoides.

Se han identificado más de 4.000 flavonoides en plantas (Harborne y Williams, 2000), que se dividen en sí mismos 6 subclases, dependiendo del estado de oxidación del anillo de pirano central: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavanoles (catequinas y proantocianidinas).

Flavonoles: tienen un doble enlace entre C₂ y C₃, con un grupo hidroxilo en la posición C₃. Representan los flavonoides más extendidos en los alimentos, con la quercetina como el compuesto más representativo. Las principales fuentes de flavonoles son las cebollas (hasta 1,2 g/kg peso fresco), col rizada, puerro, brócoli y los arándanos. (D'Archivio y col., 2007). Es importante señalar que la biosíntesis de flavonoles es estimulado por la luz, por lo que se acumulan en los tejidos exteriores y aéreos. Curiosamente, pueden existir diferencias en la concentración de los frutos de un mismo árbol e incluso entre diferentes caras de una sola pieza de fruta, dependiendo de la exposición a la luz solar (Cortell y Kennedy, 2006).

Flavonas: tienen un doble enlace entre C₂ y C₃, y son los flavonoides menos extendidos. El perejil y otras hierbas aromáticas, como la manzanilla o el romero, contienen apigenina, que junto a la luteolina, presente en los cereales, son las flavonas más comunes. La piel de las frutas también posee grandes cantidades de flavonas polimetoxiladas.

Flavononas: son análogos de las flavonas con el anillo C saturado y suelen estar glicosiladas por el carbono C₇. Las flavanonas aparecen a altas concentraciones en cítricos y en tomates, y también se encuentran en ciertas plantas aromáticas como la menta. Las flavanonas se localizan mayoritariamente en las partes sólidas de la fruta, en particular en el albedo (membranas que separan los segmentos de las frutas). Por ello, su concentración es hasta cinco veces mayor en la fruta que en los zumos.

Las principales agliconas son naringenina en el pomelo, hesperidina en naranjas y eriodictiol en limones. Se les han atribuido propiedades antiinflamatorias (Jain y Parmar, 2011, Parhiz y col., 2014) y más recientemente propiedades neuroprotectoras (Kumar y col., 2013).

Isoflavonas: poseen un anillo bencénico lateral en posición C3 y grupos hidroxilos en los carbonos C7 y C4', al igual que sucede en la estructura molecular de la hormona estriol (uno de los tres estrógenos mayoritarios junto al estradiol y la estrona). Pueden unirse a los receptores de estrógeno y se clasifican por tanto como fitoestrógenos. Las isoflavonas se encuentran casi exclusivamente en las leguminosas bien como agliconas o, más a menudo, conjugadas con glucosa. La soja y sus productos procesados representan la principal fuente de isoflavonas, entre las que se encuentran la genisteína, la daidzeína y la gliciteína. La soja contiene entre 140 y 1530 mg de isoflavonas/kg peso fresco y la leche de soja pueden contener entre 12 y 130 mg/L (Eisen y col., 2003) EISEN B. Se han descrito beneficios de las isoflavonas de soja contra la obesidad (Orgaard y Jensen, 2008).

Antocianidinas: son compuestos hidrosolubles, y constituyen uno de los grupos más importantes de pigmentos vegetales. Se encuentran principalmente como heterósidos con los tres anillos de su estructura conjugados.

La glucosilación ocurre principalmente en la posición 3 del anillo C o en las posiciones 5 y 7 del anillo A. También es posible la glucosilación de las posiciones 3', 4' y 5' del anillo B, aunque esta glucosilación aparece con menos frecuencia. Las antocianidinas están ampliamente distribuidas en la dieta humana. Se pueden encontrar en ciertas variedades de cereales, en el vino tinto y en algunos vegetales, aunque aparecen mayoritariamente en las frutas.

Flavanoles (catequinas y proantocianidinas): poseen el anillo C saturado y un grupo hidroxilo en el carbono C3. Pueden aparecer como monómeros o como polímeros con distintos grados de polimerización. Los flavanoles más representativos en los alimentos son de tipo flavan-3-ol, y estos pueden aparecer como monómeros (catequinas), como dímeros condensados entre sí y como oligómeros (proantocianidinas), o bien pueden aparecer como polímeros (proantocianidinas o taninos condensados). En las frutas podemos encontrar principalmente epicatequina y catequina. Las catequinas también se encuentran en el vino y en el chocolate. En cambio, galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina galato aparecen principalmente en el té (Arts y col., 2000). El contenido de proantocianidinas en los alimentos es bastante complicado de determinar pues poseen un amplio rango estructural y pesos moleculares muy variables (Rasmussen y col., 2005). Aun así, se siguen desarrollando nuevas técnicas de análisis, que van permitiendo a una mejor caracterización de todos estos compuestos (Valls y col., 2009).

1.2. Biodisponibilidad

La ingesta total de polifenoles se ha estimado que podría llegar a 1 gramo/día en personas con dietas ricas en frutas y bebidas como vino, té, café, o chocolate, y en menor medida en verduras y legumbres secas y cereales (Scalbert y Williamson, 2000). De todos los polifenoles, los flavonoides son los más abundantes en la dieta, alcanzando los 189.7 mg/día en las dietas occidentales (Hu, 2011). Sin embargo lo realmente interesante no es qué cantidad de polifenoles contienen los alimentos, si no qué cantidad está disponible y es absorbida por el organismo.

Los datos farmacocinéticos y de biodisponibilidad de los polifenoles no son todavía concluyentes, si bien se sabe que la absorción puede ser bien en forma nativa o modificada. Algunas publicaciones demuestran que los polifenoles en los alimentos como el chocolate, el vino tinto, o cerveza, se metabolizan a ácidos fenólicos y aldehídos por la microflora del intestino, siendo estos metabolitos los responsables de las propiedades beneficiosas que presentan (Gonthier y col., 2003, Rios y col., 2003).

La biodisponibilidad se puede definir como la fracción de un nutriente o no nutriente que está disponible para el cuerpo. Para los polifenoles en concreto, y según Torsten Bohn (Bohn, 2014), hay que tener en cuenta los siguientes procesos digestivos :1) la liberación de los polifenoles de la matriz del alimento; 2) los cambios sufridos durante la digestión gástrica o en el intestino delgado; 3) la captación celular de agliconas y algunos polifenoles conjugados por los enterocitos; 4) la fermentación microbiológica de polifenoles no absorbidos; 5) modificaciones enzimáticas que se producen en la captación en el intestino delgado o colon; 6) el transporte en el torrente sanguíneo y la redistribución del tejido posterior; y 7) la excreción por vía renal o re-excreción en el intestino a través de la bilis y los jugos pancreáticos.

2. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un término utilizado para definir a un grupo de trastornos inflamatorios intestinales crónicos, afectando principalmente al intestino grueso, de etiología desconocida. Dentro de este grupo de trastornos están incluidas la Colitis Ulcerosa (CU) y la Enfermedad de Crohn (EC). Ambas patologías se caracterizan por la aparición de una inflamación aguda recurrente de segmentos del intestino delgado y/o colon, con manifestaciones clínicas tanto intestinales como extraintestinales, que con frecuencia presentan recidivas.

La CU afecta fundamentalmente al recto y colon sigmoideo pudiendo extenderse de forma proximal y continua al resto del colon. Se caracteriza por una inflamación crónica de la mucosa colónica que da lugar a una serie de síntomas intermitentes característicos tales como sangrado rectal, diarrea y dolor abdominal. En esta enfermedad se pueden presentar una serie de complicaciones incluyendo hemorragia masiva, megacolon tóxico y cáncer de colon. No obstante, aproximadamente el 20% de los pacientes requieren resección quirúrgica del colon o colectomía con la colocación de una bolsa ileoanal. (**Figura 2**)

La EC puede afectar a cualquier área del tracto digestivo, desde la boca al ano. Preferentemente, se localiza en el ileon terminal, colon y ano. Las zonas afectadas presentan áreas normales intercaladas con zonas afectadas. Los cambios inflamatorios abarcan toda la pared intestinal y la sintomatología es diferente dependiendo de la localización. Los síntomas más comunes e independientes de la localización son la diarrea y el dolor abdominal. Cuando la EC se encuentra en fases más tardías pueden darse complicaciones derivadas de la inflamación crónica, tales como la constricción y penetración de la pared intestinal con obstrucción, fístulas y abscesos. También puede derivar en cáncer de colon. (**Figura 2**)

Figura 2. Características distintivas entre CU y EC. En rojo intenso aparecen marcadas las zonas de mayor afección en cada patología. Adaptado de Gómez-Ayala AE (2008).

Además de las complicaciones digestivas asociadas a la EII, algunos pacientes, entre el 25 y el 30 % , pueden sufrir a lo largo de su evolución una o más manifestaciones extraintestinales (EIM), siendo éstas más frecuentes en la EC.

De esta manera, podemos encontrar dos tipos de manifestaciones extraintestinales: las **asociadas a la inflamación intestinal activa** entre las que encontramos artritis, pioderma grangrenoso, eritema nodoso, iritis aftosa y estomatitis (De Simone y col., 2013) y las **autoinmunes independientes**, que aunque no se consideren derivadas de la EII, estos enfermos tienen una mayor predisposición a padecerlas. Entre éstas se encuentran: espondilitis anquilosante, cirrosis biliar primaria, alopecia areata y tiroiditis autoinmune (Patel y col., 2013, Rupp y col., 2013).

La asociación de las EIM con EII se conoce desde hace muchos años, pero los factores etiopatogénicos siguen sin estar claros. Algunos trastornos sistémicos pueden ser de origen inmunológico y están probablemente relacionados con la fisiopatología de la enfermedad intestinal; otros pueden ser secuelas de sobrecrecimiento bacteriano intestinal o complicaciones iatrogénicas de la terapia que se usa para controlar la inflamación del intestino. (Ardizzone y col., 2008). Además hay que tener en cuenta factores que aumentan la prevalencia de estas manifestaciones, se ha descrito que el tabaquismo aumenta las EIMS oculares en enfermos de CU (Roberts y col., 2014).

2.1. Patogenia

A pesar de los progresos realizados en el conocimiento de la patogenia y el mecanismo de la EII, la CU y la EC representan un reto clínico de gran importancia, ya que actualmente aún se desconocen las causas fisiopatológicas de dichas patologías y por tanto no disponemos de un tratamiento curativo. No obstante, la constante investigación en estas enfermedades ha permitido que en los últimos años se hayan producido importantes avances en el conocimiento de su mecanismo patogénico. Se considera que estas enfermedades son consecuencia de una respuesta inmune inadecuada desencadenándose una cascada de eventos que acaban en la producción exagerada de elementos proinflamatorios, provocándose una inflamación mantenida de la mucosa intestinal. Hay muchos factores que pueden participar en el desarrollo de la EII, como factores genéticos, inmunológicos y ambientales, u otros como la dieta, la depresión y el estrés. Todos ellos parecen ser cruciales para el desarrollo de la EII, pero en un grado diferente. (Soon y col., 2012).

2.1.1. Factores genéticos:

El componente genético en la patogenia de la EII se conoce desde hace ya bastante tiempo, observándose como la prevalencia es mucho más alta en miembros de una misma familia. El gran avance en el estudio y secuenciación del genoma ha permitido identificar genes que pueden contribuir a desarrollar EII.

CARD15 / NOD2 (del inglés *Nucleotide-binding Oligomerization Domain Containing 2*), ubicado en el cromosoma 16. Se han asociado mutaciones en NOD2 con el desarrollo de la EII (Ogura y col., 2001). La proteína codificada por este gen es responsable de reconocer moléculas con una estructura específica llamada muramil dipéptido (MDP), presente en la pared celular bacteriana.

Las mutaciones en dicho gen han sido relacionadas con la EC, ya que existen estudios en los que se demuestra que en pacientes con CU estas mutaciones no son mayores que en pacientes sanos, mientras que han identificado más de 30 mutaciones de CARD15 / NOD2 en pacientes con EC (Cavanaugh, 2006). Por tanto, estas alteraciones asociadas con la EC han sido relacionadas con la eliminación defectuosa de bacterias intracelulares y con una respuesta inmune defectuosa, incluyendo la activación del factor nuclear kappa-B (NF-kB) (Bosani y col., 2009).

ATG16L1 (*Autophagy-Related Protein 16-1*) está involucrado en la autofagia bacteriana. Su relación con la EC implica que una disfunción de la autofagia en estos enfermos puede desencadenar un mal funcionamiento celular y tisular en el lugar de la lesión. Además, los enfermos que padecen un polimorfismo en ATG16L1 presentan células de Paneth anormales, lo que conlleva una alteración en la secreción de péptidos antimicrobianos y, por tanto, una respuesta inmune defectuosa ante la presencia de patógenos en el intestino (Parkes y col., 2007, Lin y col., 2013)

Curiosamente, las infecciones virales pueden afectar la expresión del gen ATG16L1 y aumentar la susceptibilidad EII (Cadwell y col., 2010), lo que pone de manifiesto la interrelación entre los diversos factores en la patogenia de la enfermedad.

CDH1, gen de cadherina 1 o cadherina epitelial, proteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio. Hay un polimorfismo en el gen que predispone a CD por una disregulación de la permeabilidad intestinal permitiendo la entrada incontrolada de las bacterias a la submucosa (Muisse y col., 2009). La pérdida de CDH1 se utiliza para el diagnóstico y el pronóstico de cánceres epiteliales (van Roy, 2014).

IBD5, codifica dos proteínas transportadoras de cationes orgánicos presentes en las células epiteliales, macrófagos y linfocitos. Las mutaciones en este gen pueden aumentar el transporte de antígenos bacterianos al interior celular y regular al alza la respuesta inmune (Peltekova y col., 2004).

IL-10 (Interleucina-10): este gen codifica la citocina anti-inflamatoria IL-10. El deterioro de esta vía de señalización ha cobrado interés en los últimos años como una vía clave para evitar el desarrollo de la inflamación intestinal, y, por tanto, para la terapia de la CU (Thompson y Lees, 2011). En su función anti-inflamatoria es capaz de inhibir la

síntesis de citocinas inflamatorias por los linfocitos T y los macrófagos (Roncarolo y col., 2003, Franke y col., 2008).

Muc2 es otro factor genético importante, cuya mutación puede conducir al desarrollo EII pues proporciona una barrera mucosa insoluble que sirve para proteger el epitelio intestinal. La mutación en el gen puede conducir a estrés en el retículo endoplasmático desencadenando la disminución de la secreción de TSLP (del inglés *Thymic Stromal Lymphopoietin*). TSLP es un inhibidor de las células dendríticas y su inhibición causa sobreproducción de citocinas Th17, Th1 y Th2 citoquinas (Eri y col., 2011).

Por otra parte, se han descrito polimorfismos en algunos genes implicados en las respuestas del organismo a los productos bacterianos. En este sentido, los polimorfismos en el gen que codifica el receptor toll-like tipo 4 se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar EC y CU (Franchimont y col., 2004) También se han identificado polimorfismos en el gen que codifica los receptores toll-like tipo 9, asociado con mayor riesgo de desarrollar EC y polimorfismos relacionados con las defensinas, péptidos producidos por las células de Paneth cuya función es controlar los niveles de microorganismos en el intestino (Fellermann y col., 2006).

2.1.2. Factores ambientales

Atendiendo al último siglo, se observa que el número de enfermedades inflamatorias y autoinmunes crónicas, donde se incluye a la EII, ha aumentado considerablemente a nivel mundial y, según estudios de los últimos años, este incremento está íntimamente asociado al progreso social y económico (Sewell y Velayos, 2013). Entre los factores ambientales que han demostrado mayor implicación en la patogénesis de la EII se podrían destacar los siguientes:

La dieta

La dieta, en particular, cuando es pobre en proteínas, frutas, verduras y rica en azúcar y grasa animal puede constituir un factor de riesgo significativo para el desarrollo de la EII (Sakamoto y col., 2005, Jantchou y col., 2010). Sin embargo, no se ha podido demostrar aún una conexión directa entre la dieta y la enfermedad.

Han surgido interesantes hipótesis que asocian ciertos patrones dietéticos con la patogénesis de la EII. Por un lado, la hipótesis de los FODMAP (oligo, di- y monosacáridos fermentables pobremente absorbidos en el intestino), propuesta por Gibson y Shepherd en 2005 (Gibson y Shepherd, 2005). Esta hipótesis, aceptada hoy día, plantea la implicación de dietas ricas en carbohidratos de cadena corta y polioles en el desarrollo y progresión de esta enfermedad en individuos predispuestos genéticamente, generando cambios en la permeabilidad de la barrera epitelial del colon, así como una proliferación de determinadas poblaciones bacterianas (de Roest y col., 2013). Otra de las hipótesis más aceptadas es la de la ingestión de micropartículas exógenas (Powell y col., 2007), según la cual micropartículas derivadas de productos no biológicos ingeridos vía oral, como aditivos o componentes de las pastas de dientes (silicatos de aluminio o dióxido de titanio) son fagocitados en el lumen intestinal por su reducido tamaño, desencadenando una respuesta inmune anormal que reduce la tolerancia de la mucosa colónica (Deutschmann y col., 2013).

Según algunas publicaciones, la dieta no es un agente etiológico de la EII, pero puede influir en la actividad metabólica y contribuir a la progresión de la enfermedad (Asakura y col., 2008).

El tabaco

Fumar juega un doble papel en el desarrollo y progresión de la EII. Fumar aumenta el riesgo de CD y este riesgo se reduce sólo 4 años después de su cesación (Higuchi y col., 2012). Sin embargo, fumar parece aliviar los síntomas de la UC tanto en la prevención de su desarrollo como en la aparición de brotes leves o moderados (Aujnarain y col., 2013).

El sueño

Los trastornos del sueño pueden influir en la función del sistema inmune y el proceso de la inflamación. Existe una fuerte asociación entre la actividad de la enfermedad y la calidad del sueño, medida con Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI). Los pacientes en remisión clínica con el sueño anormal tienen una alta probabilidad de reactivarse la enfermedad (Ali y col., 2013).

Fármacos

Aunque está menos estudiado, parece ser que el uso de antibióticos, anti-inflamatorios y anticonceptivos puede desencadenar brotes de la enfermedad, ya que éstos podrían alterar la barrera intestinal (Ananthkrishnan, 2013).

2.1.3. Factores psicosociales

La ansiedad y la depresión pueden ser una causa o una consecuencia de la EII. Por ejemplo, se ha demostrado que los síntomas de los trastornos del estado anímico pueden contribuir significativamente al desarrollo de la UC (Triantafillidis y col., 2013). Por otro lado, el desarrollo de la ansiedad y la depresión en la EII está íntimamente relacionado con aparición de los síntomas somáticos, tales como diarrea, sangre en heces, y dolor abdominal. En ese sentido la perspectiva de una intervención quirúrgica contribuye a la disminución de la calidad de vida al empeorar el estado anímico. Ese incremento de ansiedad es mayor en pacientes con conocimientos específicos sobre la EII, además se ha descrito que las mujeres son más susceptibles a estas influencias negativas. (Plavsic y col., 2013).

El papel del estrés en la EII también parece ser significativo. Condiciones estresantes inducen la activación del eje hipotálamo-pituitario adrenal (HPA), que inhibe el sistema inmunológico, pudiendo producir una reacción inflamatoria sistémica en pacientes de EII. El estrés crónico es particularmente dañino, cambia la fisiología del tracto gastrointestinal mediante el aumento de la motilidad, perjudicando la secreción de agua y electrolitos, la inhibición de la secreción de ácido gástrico e incrementando la secreción de bicarbonato (Soderholm y Perdue, 2001).

2.1.4. Factores microbiológicos

Durante el primer año de vida, el intestino humano es colonizado por gran cantidad de microorganismos que suele mantenerse el resto de la vida del individuo. Esta microbiota bacteriana va a tener un importante papel en el desarrollo y posterior modulación de la respuesta inmune, así como en la metabolización de nutrientes.

La idea de que la flora microbiana intestinal estaba ligada a la patogenia de la EII ha sido propuesta desde el reconocimiento de la CU y la EC. Pese a todo no se ha descrito un grupo bacteriano propio de la enfermedad. Algunos estudios han demostrado que existe un elevado número de bacterias en contacto con la mucosa de pacientes con esta enfermedad y que las lesiones ocurren preferentemente en los segmentos donde la concentración de bacterias es mayor. También se ha visto una disminución de la diversidad microbiológica intestinal y un desequilibrio entre bacterias con propiedades pro- y anti-inflamatorias en estos enfermos, fenómenos conocido como **disbiosis** (Rigottier-Gois, 2013). Por otro lado, los tratamientos con **probióticos** han generado resultados muchos interesantes para el tratamiento de la enfermedad y otros controvertidos (Frank y col., 2007, Gardlik y col., 2012).

2.1.5. Factores inmunológicos

Las investigaciones sobre la patogénesis de la EII comenzaron con estudios de la inmunidad de la mucosa intestinal, concretamente con la función de las células T en pacientes con CU y EC, considerándose que estas células del sistema inmune adaptativo eran las responsables de la inflamación intestinal. Más recientemente, se ha demostrado el importante papel que desempeña la inmunidad innata en este proceso.

Incluso en condiciones fisiológicas, el tracto gastrointestinal se encuentra en un estado continuo de inflamación leve y el sistema inmune es responsable para el mantenimiento de la **anergia** (estado de los linfocitos en el cual éstos, pese a estar presentes, no son activos) y el control de los mecanismos reguladores locales. La interrupción de la homeostasis y la activación prolongada de la respuesta inmune local en el intestino conduce a la mayor producción de citocinas y quimiocinas que activan la respuesta celular o humoral y estimulan el progreso a EII (Koelink y col., 2012).

Inmunidad innata

La inmunidad innata representa la primera línea de defensa contra los patógenos. El intestino constituye una extensa superficie mucosa con vellosidades y criptas especialmente diseñadas para aumentar el área de contacto y favorecer la absorción de nutrientes que provienen principalmente de los alimentos. Los componentes del intestino interactúan con los alimentos y con más de 400 especies diferentes de bacterias que se alojan en la mucosa y facilitan procesos asociados con la nutrición (Coombes y col., 2005). En el sistema inmune intestinal la inmunidad innata está constituida fundamentalmente por la barrera intestinal, así como por las células inmunes donde se incluyen neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CD) células de Paneth y *Natural Killer* (NK), cuya función consiste en la identificación y eliminación de antígenos extraños.

Los pacientes de EII poseen alterada la permeabilidad de la barrera intestinal, presentando anomalías en la producción de moco y resistencia epitelial, lo que permite el paso libre de antígenos hacia la lámina propia (Motilva y col., 2008). En parte, la respuesta innata frente a productos bacterianos está regulada por las proteínas citoplasmáticas NOD2/CARD 15 ya descritas anteriormente. Como se ha comentado mutaciones en el gen de NOD2/CARD 15, están asociadas con una mayor susceptibilidad a desarrollar EII. Estas alteraciones producen defectos en la actividad bactericida de los macrófagos, lo que conduce a infecciones intracelulares persistentes

con estimulaciones crónicas de células T, así como también en la función de barrera de las células epiteliales, incrementando la exposición a la microflora. Además se ha descrito que en enfermos de EII, las células inmunes de la barrera intestinal generan una respuesta inmune inadecuada y exagerada frente a los constituyentes normales de la microbiota bacteriana intestinal (Hart y col., 2005, Cucchiara y col., 2012).

Por todo ello se considera que existen suficientes evidencias de que una inmunidad innata defectuosa podría ser un componente clave, o incluso desencadenante, de la EII.

Inmunidad adaptativa

Además de la inmunidad innata, en el organismo se ha desarrollado un sistema inmune adquirido o adaptativo para proteger las superficies mucosas. Al contrario que la respuesta inmune innata, la inmunidad adaptativa tarda más tiempo en desarrollarse y depende fundamentalmente del tipo de células T (Bouma y Strober, 2003). Además se trata de una respuesta específica contra el antígeno y que genera memoria inmunológica, por lo que induce una defensa duradera.

Las dos formas principales de EII, EC y CU, generan distintas respuestas inmunes basadas en el tipo de citocina dominante producida. Así, la mucosa de pacientes con EC establecida está dominada por linfocitos T colaboradores (*helper*) de tipo 1 (Th1), caracterizados por la producción de interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2). La IL-12 y la IL-18 parecen las citocinas principalmente responsables de la polarización a Th1, si bien la IL-21 puede ser también importante (Gordon y col., 2005). IFN- γ es el responsable del aumento de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, facilitando el reclutamiento de células inflamatorias y la activación de los macrófagos. Estos macrófagos producen, a su vez, especies reactivas de oxígeno y grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Serriari y col., 2014).

Por el contrario, en la CU la mucosa estaría dominada por linfocitos colaboradores T tipo 2 (Th2), con una respuesta atípica, caracterizada por la producción de interleucinas 4 y 13 (IL-4 e IL-13). La respuesta Th2 implica la activación de linfocitos con actividad citotóxica innata o *natural killer* (NK) que pueden ser responsables de la inflamación a través de la producción de IL-13 (Targan y Karp, 2005, Geremia y col., 2014).

Más recientemente, se descubrió una tercera población de linfocitos T cooperadores denominada Th17, las cuales requieren IL-23, TGF- β 1 (*Transforming Growth Factor beta*) e IL-6 para su diferenciación y crecimiento, siendo su principal producto la IL-17, la cual interviene tanto en la homeostasis intestinal como en el control de infecciones bacterianas y fúngicas (Stockinger y col., 2007). Estas células, a través de la IL-17, pueden promover:

- La migración, expansión y función de los neutrófilos.
- La maduración de las células dendríticas y la estimulación de las células T durante su primer contacto antigénico.
- La producción de mediadores inflamatorios como la IL-1, IL-6, IL-8 (Ouyang y col., 2008).

Los linfocitos Th17 median en la respuesta inflamatoria y el daño tisular en una infección y en condiciones inflamatorias auto-inmunes y se ha demostrado que están involucrados en la patogénesis tanto de la CU como de la EC (Abraham y Cho, 2009).

Especialmente interesante es el estudio de las células T reguladoras (*Treg*), consistente en una subpoblación especializada de células que actúan suprimiendo la activación del sistema inmune, manteniendo así la homeostasis y favoreciendo la tolerancia hacia autoantígenos. Varios estudios han detectado una disminución en el número de células *Treg* en la mucosa inflamada de pacientes con EII (Brimnes y col., 2005), e investigaciones en modelos animales muestran que la administración de estas células es beneficiosa para la curación de la colitis experimental (Huibregtse y col., 2007), sugiriendo su posible utilización en terapéutica.

Existen diferentes variedades de estas células, entre las que se incluyen los linfocitos T CD4⁺CD25, que ejercen su función supresora inmune fundamentalmente a través de la secreción de citocinas como la IL-10; y los linfocitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3, que requieren contacto celular y citocinas para su función.

2.2. Tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Como se ha comentado con anterioridad, la EII es una patología con carácter crónico y recurrente, para la que actualmente no se dispone de un tratamiento curativo. El principal tratamiento para esta patología es inducir y mantener un estado de remisión clínica, así como reducir el número y la duración de las recaídas, siendo de vital importancia que el tratamiento esté adecuado a la severidad, segmento intestinal afectado, historia evolutiva, estado nutricional y existencia de complicaciones presentados en el paciente. En la actualidad, las terapias anti EII disponibles se basan principalmente en el control de la inflamación y alivio del dolor abdominal y se dividen en convencional y operativa. El tratamiento convencional (farmacoterapia) se utiliza en remisión y exacerbación, que caracterizan tanto la EC y CU, y el tratamiento quirúrgico se realiza en estado grave de la EII. Sin embargo, estos tratamientos todavía requieren mejoras que nos permitan reducir la sintomatología y la prevalencia de la enfermedad.

2.2.1. Tratamiento farmacológico

Los fármacos empleados en el tratamiento de la EII no responden a un grupo homogéneo. Son fármacos con propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras que controlan y resuelven lesiones agudas. Como en todos los fármacos habrá que tener en cuenta los posibles efectos secundarios que puedan presentar en los pacientes además de las posibles resistencias adquiridas. Los fármacos más empleados son:

Aminosalicilatos

Los fármacos más comunes utilizados en la EII la farmacoterapia son derivados aminosalicilatos, como el ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, mesalazina) y su derivado sulfasalazina, que muestran potencial anti-inflamatorio. Son responsables de la inhibición de la síntesis de mediadores inflamatorios derivados del ácido araquidónico (AA), tales como leucotrienos (LT4) o prostaglandinas, aumento de la producción de IgA e IgG, y la migración de células inflamatorias en la mucosa (Lopez y Peyrin-Biroulet, 2013).

Los aminosalicilatos son considerados como terapia segura y eficaz frente a EC leve o moderada. Su administración es oral o mediante enemas, y sólo en el colon se produce la escisión enzimática, liberando el ingrediente activo (Marshall y col., 2010). Los efectos secundarios de los aminosalicilatos incluyen dolor abdominal, náuseas, vómitos y pérdida de apetito, alergia en la piel, disminución del número de glóbulos blancos, amague hígado. El uso a largo plazo puede conducir a la impotencia en los hombres (Marshall y Irvine, 2000).

Corticosteroides

Los corticosteroides, que incluyen entre otras la budesonida y dipropionato de beclometasona, son una alternativa de tratamiento para los pacientes con EII que no responden a 5-ASA. Los corticosteroides inhiben el desarrollo de la fase temprana del proceso inflamatorio y reducen la cascada inflamatoria de citocinas (Girlich y Scholmerich, 2012).

Se utilizan fundamentalmente en las fases de reactivación y/o empeoramiento de la enfermedad. Son eficaces en el 60-80% de los pacientes en el momento de la recaída (Nunes y col., 2013). Sin embargo, el uso de corticosteroides no protege contra posteriores recaídas, ya que no conduce a la curación de la mucosa, que es crucial para el control de la inflamación y el restablecimiento completo de la función fisiológica del intestino.

El uso de corticoides se asocia con numerosos efectos secundarios, a menudo irreversibles, y por lo tanto su uso debe limitarse. Durante el tratamiento con corticosteroides se ha descrito como necesaria la suplementación con calcio y vitamina D (Sobczak y col., 2014).

Inmunosupresores

Destacan las tiopurinas como la azatioprina (AZA) y su metabolito activo 6-mercaptopurina (6-MP) son antimetabolitos estructurales de las purinas, que son esenciales para la formación de los ácidos nucleicos. Al inhibir la síntesis de ADN conducen a la inhibición de la proliferación de las células que participan en la respuesta inmune (monocitos), y la interrupción de la síntesis de inmunoglobulinas (Maltzman y Koretzky, 2003). Por su eficacia y seguridad, las tiopurinas, son actualmente, el tratamiento de elección en la terapia de mantenimiento en la EII.

La ciclosporina y la ciclofilina, una proteína citoplasmática, forman un complejo, que se une a la calcineurina. El proceso desencadena la estimulación de la síntesis de IL-2 inhibiendo las respuestas inmunológicas humoral y celular y modificando el proceso inflamatorio (Yamaguchi y col., 2011). Por otra parte, la ciclosporina influye en la producción de linfocitos T e inhibe indirectamente la producción de anticuerpos y la activación de los macrófagos. El efecto beneficioso de la ciclosporina se ha demostrado en pacientes con fístulas persistentes y observándose una mejora inmediata en aproximadamente el 85% de los casos de CD. Sin embargo, el efecto positivo a largo plazo sólo se observó en aproximadamente el 54% de los casos (Renna y col., 2012).

El micofenolato de mofetilo (MMF) es un profármaco, tras la administración pasa a ácido micofenólico (MPA), que actúa sobre los linfocitos T y B impidiendo que

ataquen a células sanas, aunque también debilita la resistencia frente a infecciones. Se utiliza principalmente en CD durante su exacerbación (Palaniappan y col., 2007).

Antibióticos

El uso de antibióticos se utiliza en la EII como terapia primaria y para el tratamiento de co-infecciones. Sus principales indicaciones son la presencia de abscesos o fístulas, enfermedad de Crohn, y la inflamación del reservorio en pacientes operados (Nguyen, 2012). Los más comunes y conocidos son la ciprofloxacina y metronidazol, pero también hay estudios que caracteriza el tratamiento eficiente EII con rifaximina y ornidazol (Wang y col., 2012). También aumentan la probabilidad de remisión cuando se combina con budesonida.

2.2.2. Terapia biológica

La era de la terapia biológica comenzó en el año 1998 cuando la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el primer agente anti-TNF para el tratamiento de la EC (Targan y col., 1997). Éste fue el infliximab, usado actualmente para inducir la remisión de la EC activa intraluminal y fistulizante en pacientes que no han respondido al tratamiento estándar o en pacientes corticodependientes.

Terapias antifactor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)

TNF- α es una citocina proinflamatoria producida por los macrófagos, linfocitos T activados, monocitos y mastocitos de la mucosa intestinal y con un papel clave en la EII. Por este motivo, numerosos tratamientos están siendo ensayados para bloquear la acción de esta citocina en varios puntos. Así, infliximab, adalimumab y certolizumab son anticuerpos monoclonales dirigidos contra TNF- α .

Infliximab: anticuerpo monoclonal quimérico de origen 75% humano y 25% murino, que actúa a través de la unión y neutralización de TNF- α y la inducción de la apoptosis de las células T. Se ha descrito mejoría clínica de los síntomas de EII después de una sola dosis intravenosa de infliximab en dos tercios de los casos y aproximadamente un tercio de los pacientes logró una remisión completa (Cassinotti y Travis, 2009). El infliximab suele utilizarse junto con otros inmunosupresores tales como la azatioprina para conseguir la remisión de la enfermedad (Lemann y col., 2006). Los efectos secundarios de infliximab incluyen, entre otros, dolor abdominal, mareo, náuseas, diarrea y fiebre.

Adalimumab: anticuerpo monoclonal humano indicado principalmente para aquellos pacientes de EC intolerantes o resistentes a infliximab (Fisher y col., 2013). Entre los efectos secundarios de adalimumab se encuentran infecciones de las vías respiratorias, infecciones fúngicas en la piel y las membranas mucosas, náuseas, diarrea, erosiones y úlceras en la boca.

Certolizumab: anticuerpo humanizado que contiene un grupo polietilenglicol en un fragmento Fab de su estructura, para prolongar su vida media, ya que su administración es mensual (Verma y col., 2011). Se usa en el tratamiento de la EC en pacientes que no responden a otros fármacos.

Ligandos de PPAR- γ (del inglés Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ)
PPAR- γ se expresa en las células epiteliales de la mucosa intestinal, macrófagos y

granulocitos y juega un papel importante en la fagocitosis. Se ha sugerido que ligandos de PPAR- γ reducen la inflamación y se propone como factores de prevención y de terapia contra la IBD. Pasceri y sus colaboradores (Pasceri y col., 2001) demostraron que los agonistas de PPAR- γ disminuyen la síntesis de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y la producción de IL-8 por las células endoteliales.

Troglitazona, un agonista de PPAR, ha mostrado reducir la expresión inducida por citocinas de moléculas de adhesión VCAM-1 e ICAM-1, lo que conduce a la disminución de la quimiotaxis, adhesión e infiltración de monocitos al endotelio y alivia la inflamación intestinal. Otro agonista de PPAR- γ , rosiglitazona, mejora significativamente el proceso inflamatorio, como se evidencia por una disminución de los niveles de MPO, TNF- α , PGE2 y la COX-2 (Ramakers y col., 2007).

Inhibidores de la diferenciación y activación de las células T

Para bloquear la diferenciación y activación de las células T se pueden emplear anticuerpos monoclonales frente a las citocinas implicadas en dicho proceso, entre las que se encuentran la IL-12, IL-18 y el IFN- γ . Mientras que los anticuerpos anti-IL-18 sólo han sido ensayados en modelos animales (Ten Hove y col., 2001), los anticuerpos anti IL-12 ya han sido probados en ensayos clínicos. Así, un estudio randomizado demostró una respuesta en el 75% de los pacientes tratados con anticuerpos anti IL-12 comparado con un 25% en el grupo placebo. Además, en los pacientes que recibieron el tratamiento con anti-IL-12 se detectó una disminución de la secreción de IL-12, IFN- γ y TNF- α (Mannon y col., 2004).

En relación al IFN- γ , fontolizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado, dirigido contra esta citocina que bloquea la polarización de la respuesta inmune hacia la vía Th1 inducida por IFN- γ , así como la activación de los macrófagos, monocitos y linfocitos NK. Algunos estudios han mostrado datos interesantes aunque son necesarios estudios más exhaustivos (Rutgeerts, 2002, Hommes y col., 2006).

Tratamientos basados en la inhibición de la adhesión celular

La migración y el reclutamiento de linfocitos por la mucosa intestinal es un paso fundamental en el inicio y autoperpetuación de la inflamación en la EII. El bloqueo selectivo de las moléculas de adhesión implicadas en este proceso se ha logrado mediante la utilización de anticuerpos monoclonales antiintegrinas, así como por oligonucleótidos antisentido dirigidos contra la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1).

Natalizumab: anticuerpo monoclonal que bloquea a las integrinas y, por tanto, la consecuente migración de leucocitos dentro del tracto gastrointestinal. Fue comercializado en 2004, pero meses después se retiró temporalmente por ocasionar leucoencefalopatía multifocal progresiva (pérdida de sustancia blanca en el cerebro). Poco después se ha vuelto a comercializar para el tratamiento de la esclerosis múltiple y EII, aunque de forma restrictiva (Ghosh y col., 2012).

Vedolizumab: anticuerpo humanizado anti- β 7-integrina (MLN-02) que inhibe selectivamente la adhesión de leucocitos del tracto gastrointestinal. Recientemente ha completado una serie de ensayos clínicos fase 3 para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa que demuestran que vedolizumab es un eficaz y fármaco bien tolerado (Mosli y Feagan, 2013).

Actualmente, la investigación se centra en la búsqueda de nuevas terapias biológicas, sumándose a las anteriores, con la producción de inhibidores de los receptores de citocinas pro-inflamatorias, tratamiento con citocinas anti-inflamatorias como IL-10 o IL-11, factores de crecimiento, terapias anti-CD4, inmunoestimulantes o basadas en el uso de ácido ribonucleico (ARN) de interferencia (Taba Taba Vakili y col., 2012, Nanda y Moss, 2012).

2.2.3. Modulación de la flora intestinal

Las evidencias del papel de la flora intestinal en la patogénesis de la EII han conducido a la suposición de que la manipulación de dicha flora podría proporcionar beneficios terapéuticos. Así, están surgiendo nuevos tratamientos que pretenden alterar el ambiente luminal utilizando probióticos y prebióticos (Hedin y col., 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define **probiótico** como: “microorganismos vivos que, cuando son suministrados en cantidades adecuadas, promueven beneficios en la salud del organismo huésped”. Ya han sido empleados en algunos ensayos clínicos en pacientes con EII con algunos resultados beneficiosos (Schultz y col., 2004). Recientemente, se ha demostrado la eficacia de esta terapia en la remisión de la CU activa en niños (Miele y col., 2009).

El modo de acción de los probióticos es complejo y no se conoce del todo. Se han identificado un gran número de especies probióticas, la mayoría de las cuales tienen diferentes mecanismos de acción. Además se ha visto que el modo de acción de un probiótico dado puede variar en función de la presencia de otros probióticos o bacterias entéricas en el medio ambiente circundante (Shanahan, 2004). En cualquier caso se han descrito diferentes métodos de acción entre los que se incluyen modificación adhesión mucosa intestinal, estimulación del sistema inmune mediante la modulación de citocinas, regulación de proliferación celular y apoptosis (Geier y col., 2007).

Los **prebióticos** no son organismos vivos, sino hidratos de carbono complejos, tales como fructooligosacáridos y la goma guar, que son resistentes a la digestión en el intestino delgado y son el sustrato preferido de ciertas bacterias intestinales, aumentando su crecimiento y proliferación. Hasta ahora, los datos clínicos con prebióticos en EII son limitados a pesar de los buenos resultados obtenidos en estudios animales (Videla y col., 2001). Hay evidencias claras en modelos animales de que la suplementación prebiótica de la dieta puede proporcionar una opción terapéutica en el tratamiento de la EII, sin embargo, no se debe aceptar que todos los prebióticos son beneficiosos. Como es el caso con probióticos, no todos los prebióticos tienen efectos anti-inflamatorios, incluso algunos prebióticos pueden aumentar la gravedad del daño inflamatorio. Un ejemplo de prebiótico que ha demostrado efectos antagónicos en el intestino es fructooligosacáridos (FOS) (Geier y col., 2007).

2.2.4. Tratamiento quirúrgico

Como norma general, la cirugía en la EII se indica cuando fracasa el tratamiento médico, ante complicaciones específicas graves como megacolon tóxico, hemorragia severa o perforación, en el caso de la CU y obstrucción intestinal completa, abscesos no susceptibles de un tratamiento menos agresivo o perforación intestinal libre en la EC e incluso para evitar o tratar un cáncer. Alrededor de un 30 – 45% de los enfermos con CU

y un 70 – 90% de EC precisarán cirugía en el transcurso de su enfermedad aunque las diferencias presentadas por la CU y la EC en cuanto a localización, afección a la pared intestinal, frecuencia de las recaídas y aparición de complicaciones obligarán a tomar una decisión distinta para cada una de ellas. A este respecto, la resección en enfermos de CU erradica la enfermedad, aunque en el caso de pacientes de EC pueden presentar recurrencia (Bordeianou y Maguire, 2013, Maggiori y Panis, 2014).

2.2.5. Terapia nutricional

Los pacientes con EII suelen presentar diferentes trastornos digestivos relacionados con la alimentación valorándose una disminución de la ingesta, por causas como náuseas, vómitos, dolor abdominal o diarrea. Además suelen presentar una menor absorción y, por tanto, necesitar un requerimiento energético mayor. Estos factores conducen con facilidad a un estado de malnutrición energético-proteica, así como a alteraciones del estatus de diversos micronutrientes, algunos con importantes funciones metabólicas. En cualquier caso, son alteraciones de razonable relevancia en la EII.

En los últimos años han cobrado especial interés los estudios en los que se han empleado **nutraceúticos** para tratar enfermedades con base inflamatoria, como son la EII, la artritis reumatoide y el asma. A este respecto, Calder (Calder, 2013), hace una recapitulación de la importancia del EPA y DHA, PUFAs encontrados en el aceite de pescado capaces de inhibir, al menos parcialmente, determinados aspectos de la inflamación como la quimiotaxis leucocitaria, la expresión de moléculas de adhesión leucocito-endotelio, la producción de eicosanoides como prostaglandinas y leucotrienos derivados de ácidos grasos omega-6 (ω -6) y AA, la producción de citocinas inflamatorias y la reactividad de las células T. Los mecanismos que subyacen a las acciones anti-inflamatorias de estos ω -3, incluyen alteraciones de los fosfolípidos de membrana, inhibición del factor de transcripción NF κ B, activación del factor PPAR- γ y unión al receptor acoplado a proteína G, GPR120. Parece ser que, en adultos, una ingesta de EPA+DHA a razón de 2g/día es suficiente para producir efectos anti-inflamatorios, aunque hay aún pocos estudios al respecto. Sin embargo, en modelos animales de artritis reumatoide, asma y EII se han demostrado los efectos beneficiosos de los ω -3.

La intervención nutracéutica para restablecer la homeostasis intestinal requiere una estrecha relación entre el intestino y la microbiota asociada. El sistema inmune está expuesto diariamente a diferentes antígenos, tanto ambientales como los que acompañan a la comida. Así, tanto el sistema linfóide como las placas de Peyer y los folículos linfoides se encuentran alerta para responder a estos antígenos. Las células epiteliales están en estrecha cooperación con los linfocitos intra-epiteliales y poseen receptores Toll-like (TLRs) y Nod-like (NLRs), los cuales sirven para detectar patógenos o moléculas patrón asociadas a patógenos. Parece ser que una exposición crónica a microorganismos del ambiente está asociada con una menor frecuencia de cáncer. Así pues, los nutraceúticos en forma de prebióticos, probióticos, PUFAs, aminoácidos y polifenoles, han demostrado modular la microbiota intestinal así como los efectos inflamatorios a nivel celular y molecular en el intestino (Sans, 2009, Rastall, 2010, Magrone y Jirillo, 2013).

La fisiopatología de la EII no está todavía esclarecida y las terapias actuales no proporcionan una curación completa. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas dianas para el control terapéutico es permanente. Además, otras investigaciones tratan de mejorar las

formas de administración, introduciendo por ejemplo el uso de nanopartículas, ya que hoy en día la mayoría de los fármacos en la terapia de la EII son de administración sistémica.

2.3. Modelos animales de inflamación intestinal

Gran parte de los progresos recientes en la comprensión de la inmunidad de la mucosa y la fisiopatología en el intestino se han logrado mediante el desarrollo de nuevos modelos animales experimentales de inflamación intestinal crónica (Wirtz y Neurath, 2007).

Estos modelos se pueden dividir en cuatro categorías: 1) modelos espontáneos de colitis, 2) modelos de colitis inducida por agentes químicos, en roedores con un sistema inmune normal, 3) modelos de adopción de transferencia en animales inmunodeprimidos, y 4) modelos genéticamente modificados (con ratones *knockout* [KO] y ratones transgénicos), como se muestra en la **Tabla 1**. Estos modelos han dado lugar a una rápida progresión en el conocimiento, que desde 1993 han producido cerca de 20 propuestas de inflamación intestinal (Hibi y col., 2002).

Tabla 1. Resumen de los modelos animales de inflamación intestinal crónica.

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">1) Modelos de ingeniería genética.<ul style="list-style-type: none">+ Modelos de ratones knockout.<ul style="list-style-type: none">- Ratones IL-2 knockout.- Ratones IL-10 knockout.- Ratones STAT3 knockout.- Ratones TNF-3' UTR knockout.+ Modelos de ratones y ratas transgénicos.<ul style="list-style-type: none">- Ratones IL-7 transgénicos.- Ratones STAT-4 transgénicos.- Ratas HLA B27 transgénicas.2) Modelos de colitis espontánea.<ul style="list-style-type: none">+ Ratones C3H/HeH/Bir.+ Ratones SAMP/Yit.3) Modelos de colitis inducible. Agente inductor:<ul style="list-style-type: none">+ Ácido trinitrobenzenesulfónico (TNBS).+ Oxazolona.+ Dextrano sulfato sódico.+ Carragenina.+ Polisacárido peptidoglicano.4) Modelos de transferencia.<ul style="list-style-type: none">+ CD4+/CD45R B^{high} células T.+ Hsp60 en CD8 de células T. |
|---|

Kühn y colaboradores desarrollaron un modelo de ratón deficiente en el gen de IL-10. Estos animales, cuando salen de un ambiente libre de patógenos (SPF, en inglés *specific pathogen free*) y son mantenidos en condiciones normales desarrollan enterocolitis crónica. Las lesiones se observan principalmente en el duodeno, el yeyuno proximal y colon ascendente. En el duodeno y el yeyuno se producen engrosamientos patológicos de las paredes intestinales, debido a los cambios hiperplásicos. En el colon,

se detecta el agotamiento de las células caliciformes, una degeneración del epitelio, acompañada de una infiltración de células productoras de IgA en plasma, y un aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II. (Kuhn y col., 1993).

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria producida por las células T, las células B, los macrófagos, las células del timo, y los queratinocitos. Esta citocina interfiere con la síntesis de IL-12 (D'Andrea y col., 1993, Hsieh y col., 1993), el factor de maduración de los linfocitos citotóxicos y el factor estimulante de las células NK. El bloqueo de la producción de IL-12 conduce a la inhibición de interferón-gamma (IFN- γ), una citocina Th1. La IL-10 también inhibe la producción de IL-2, un factor de crecimiento de las células T. Además, en los macrófagos, la IL-10 inhibe la producción de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, y TNF- α (Minty y col., 1997). Los tipos de citocinas inhibidas por la IL-10 indican por qué se considera una citocina anti-inflamatoria y beneficiosa para las patologías inducidas por respuestas celulares de tipo 1 (Th1) y la inflamación (Eisener-Dorman y col., 2009).

3. CÁNCER DE COLON

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más común y la segunda causa de muerte por cáncer en los países industrializados, incluyéndose España. Anualmente, se diagnostican un millón de nuevos casos por todo el mundo, la mayoría en Estados Unidos y Europa y menos frecuentemente en África. Este tipo de cáncer es sin duda una de las complicaciones más severas de la EII, considerada como una patología inmuno-inflamatoria crónica y recidivante.

Se sabe desde hace casi un siglo que la CU está asociada con un mayor riesgo de desarrollar CCR (ROSENQVIST y col., 1959). Sin embargo, la asociación entre CCR y EC ha sido conocida más recientemente. En 2001 el equipo de Eaden observó que el riesgo acumulado de desarrollar CCR en pacientes con CU es del 2% a los 10 años, del 8% a los 20 años y del 18% a los 30 años (Eaden y col., 2001). Por tanto, la duración de la colitis es uno de los factores de riesgo más importantes que contribuyen al desarrollo del CCR, así como también la extensión anatómica de la enfermedad y la edad en el momento del diagnóstico. Así, en un paciente con CU, la duración media desde el momento en el que se le diagnostica esta enfermedad hasta que desarrolla CCR es de unos 17 años, siendo la edad media del diagnóstico del cáncer de 51 años en hombres y 54 años en mujeres. Otros factores de riesgo que han sido implicados en el desarrollo del CCR son el grado de inflamación colónica o antecedentes familiares de CCR (Xie y Itzkowitz, 2008).

3.1. Etiopatología

En la etiología del CCR se encuentran factores hereditarios y esporádicos, con la EII de fondo pues el estrés oxidativo presente en la mucosa inflamada altera las funciones celulares. Las mutaciones genéticas suelen estar en genes críticos, como son los genes supresores de tumores o los genes asociados a la reparación de ADN (Coppede y col., 2014). En el caso de tumores esporádicos estos suelen deberse a mutaciones somáticas (en los mismos genes que en los casos hereditarios) producidas normalmente por causa de una exposición a factores ambientales. Los factores dietéticos son responsables de hasta un 90% de los casos de cáncer de colon (Campos y col., 2005).

Además de la etiología comentada hay una serie de factores que incrementan la aparición del cáncer colorrectal (Araujo y col., 2011). Destacan:

- a) Ingesta de una dieta rica en calorías y lípidos (sobre todo los de origen animal), las carnes rojas, y los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el pescado y carne a la parrilla.
- b) Ingesta de grandes cantidades de alcohol.
- c) Presencia de ciertos síndromes o enfermedades, incluyendo la obesidad o la diabetes que claramente aumentan el riesgo de incidencia de CCR.

Del mismo modo se conocen factores que reducen la incidencia de este cáncer:

- a) Dieta rica en frutas y vegetales.
- b) Bebidas, como el agua mineral, el vino tinto o el té verde.
- c) Micronutrientes, como las vitaminas A, C, E y D; el ácido fólico y el calcio.
- d) Medicamentos, como antiinflamatorios no esteroideos.
- e) Ejercicio físico.

Numerosas evidencias sugieren que la propia inflamación crónica es el factor etiopatológico principal del CCR asociado a colitis, debido a fallos en la respuesta de la inmunidad innata y adquirida y pérdida de tolerancia a las bacterias intestinales y otros patógenos (Motilva y col., 2008). Desde hace unos años empiezan a dilucidarse los mecanismos que explican cómo la inflamación afecta al desarrollo tumoral. En este sentido, parece que el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) juega un papel fundamental en diferentes tipos de tumores, y su activación está asociada con el aumento de la mortalidad. Es sabido que los principales genes alterados en el cáncer se agrupan en varias vías de señalización y que todas desembocan en la activación de HIF-1, el cual controla aspectos clave de la carcinogénesis (Dang y col., 2006). Este factor puede ser activado por la acción de las citocinas, prostaglandinas generadas por la acción de la COX-2, prostaglandina sintasa 1 (PGS1) o bien por el óxido nítrico (NO) liberado por la óxido nítrico sintasa (NOS) (revisado en (Lopez-Lazaro, 2006). Los mecanismos tumorigénicos de estas enzimas son varios. La síntesis de citocinas, así como las vías activadas por COX-2, están inducidas en algunos tipos de cánceres, particularmente en CCR y, las PGs están relacionadas con procesos como la estimulación del crecimiento celular, angiogénesis y supresión de la inmunidad. De hecho, hay PGs que inhiben la apoptosis y promueven la carcinogénesis del colon (Zamuner y col., 2005). La expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) está regulada por vías de señalización que incluyen los factores de transcripción NFκB y la proteína activadora 1 (AP-1), mientras que esteroides, el NO, y p53 reducen su expresión. El NO tiene un papel dual, dependiendo de la enzima que lo sintetice y de las condiciones fisiopatológicas del tejido donde se genere. Así pues, concentraciones altas de NO juegan un papel destacado en la iniciación, promoción y progresión de los tumores dañando directamente al ADN, inhibiendo su reparación, bloqueando la apoptosis y contribuyendo a la angiogénesis.

El estrés oxidativo es un factor muy importante en la progresión de la carcinogénesis asociada a la inflamación. A este respecto, las células inflamatorias producen, en su metabolismo, radicales libres de oxígeno y de nitrógeno que dañan a los ácidos nucleicos y a las proteínas, induciendo la peroxidación lipídica de la porción hidrofóbica de la membrana celular y generando hidroperóxidos cíclicos altamente

tóxicos, que causan graves perturbaciones en la membrana celular e incluso mutaciones en el ADN.

Entre los factores celulares y moleculares que relacionan un proceso inflamatorio y el cáncer, destacan las plaquetas. Éstas juegan un papel fundamental en la inflamación por su comunicación con leucocitos y células endoteliales, además de liberar lípidos como TXA₂, factores de crecimiento y activadores de angiogénesis. La activación de las plaquetas ocurre de forma tanto autocrina como paracrina, permitiendo el reclutamiento de leucocitos en diferentes tejidos y cambios fenotípicos en las células estromales, lo cual contribuye al desarrollo de enfermedades como la aterosclerosis, inflamación intestinal y cáncer (Dovizio y col., 2014). Estos factores pueden causar un proceso inflamatorio y un fenotipo canceroso en otras células a través de una inducción persistente de COX-2 y una alta producción, fundamentalmente, de PGE₂. Es más, diversos estudios han demostrado que la aspirina reduce la incidencia de CCR por su papel inhibitorio de la COX-2 (Lee y col., 2012, Ng y col., 2014). Entre los factores moleculares que relacionan los procesos inflamatorios y el cáncer destacan las evidencias relacionadas con el factor NFκB. Desde hace años se conoce bien su función como regulador de genes pro-inflamatorios, pero son más recientes los datos sobre su papel en relación al crecimiento no controlado, inhibición de la apoptosis, metástasis y angiogénesis (Sarkar y Li, 2008, Al-Halabi y col., 2011). Las estrategias farmacológicas actuales para su regulación se dirigen hacia el control de los mecanismos que producen su activación persistente, como ocurre en patologías inflamatorias crónicas (Tan y col., 2013). Otra vía relacionada es la del factor PPAR-γ, que está siendo explorada actualmente, ya que se ha comprobado su importante papel en la progresión del cáncer inhibiendo la proliferación celular exagerada presente en un tumor y su invasión a los tejidos adyacentes, además de su control en la producción de citocinas pro-inflamatorias (Bertin y col., 2013, Rousseaux y col., 2013).

En resumen, el CCR es una patología donde los factores ambientales, y una predisposición genética, hacen que su progresión sea mayor. En este tipo de cáncer la inflamación juega un papel fundamental, ya que pacientes con CU o EC tienen mayor probabilidad de desarrollar CCR. La formación incontrolada de radicales libres puede provocar daños en el ADN y, esto, sumado a que se trata de una zona expuesta a desechos y bacterias intestinales, desencadenaría una respuesta inflamatoria exagerada.

3.2. Prevención

El riesgo de desarrollar CCR en pacientes con EII ha conducido a la adopción de programas de vigilancia para su detección precoz, con el fin de reducir la morbilidad y la mortalidad asociada a este tipo de cáncer. En este sentido, la estrategia de vigilancia más reciente es la realización de colonoscopias a los pacientes que hayan padecido CU durante 8-10 años, al menos cada dos años. Esta es la única manera de detectar los signos tempranos de la displasia. De esta forma, y si se descubre a tiempo, este tejido neoplásico puede ser eliminado mediante cirugía, previniendo así el desarrollo del cáncer. En pacientes con EC se aconseja el examen colonoscópico si la afectación de al menos un tercio del colon persiste durante más de 8 años (Ahmadi y col., 2009).

El uso de la farmacoterapia como medida potencial para reducir el riesgo de CCR se ha estudiado ampliamente. En este sentido, el agente más ensayado para la quimioprevención es el 5-aminosalicilato. Varios estudios observacionales demostraron un menor riesgo de desarrollar CCR o displasia en pacientes que tomaron este fármaco

(Rubin y col., 2008). Si este agente puede prevenir la neoplasia colónica mediante la supresión de la inflamación, se podría pensar que otros medicamentos antiinflamatorios usados en el tratamiento de la EII como los esteroides o AINE deberían ser protectores contra el CCR. En este sentido, varios estudios han mostrado que el uso de esteroides tópicos y sistémicos resultó en una reducción del riesgo de CCR. Sin embargo, estas moléculas no pueden ser utilizadas durante largos periodos de tiempo debido a sus efectos tóxicos (Velayos y col., 2010). Los AINE, incluyendo los inhibidores selectivos de COX-2, han mostrado tener un efecto preventivo en los tumores de colon, aunque su uso también se encuentra limitado debido a sus efectos adversos (Iwama, 2009).

Otro agente ensayado para la quimiopreención del CCR es el ácido ursodesoxicólico, que ha demostrado reducir el riesgo de displasias en pacientes con CU (Alberts y col., 2005) y en modelos animales de CCR (Kohno y col., 2007). Otras moléculas evaluadas con este fin incluyen el ácido fólico (Hubner y Houlston, 2009), las estatinas (Poynter y col., 2005) e inmunosupresores como azatioprina o 6-mercaptopurina (Matula y col., 2005). No obstante, existen datos insuficientes sobre el papel de estos fármacos como agentes quimiopreventivos para el desarrollo del CCR.

4. PAPEL DE LOS POLIFENOLES

Gran parte de la evidencia sobre los efectos protectores de los polifenoles se deriva de experimentos realizados *in vitro* o en modelos animales, mediante el empleo de concentraciones mucho más altas que las que generalmente contenida en la dieta humana (Veres, 2012). En este sentido, algunos de los polifenoles descritos como favorables para la salud se caracterizan sin embargo por presentar cierta toxicidad retrasando el crecimiento, tras un consumo excesivo en aves de corral, ganado y animales de laboratorio. Sin embargo, la ingesta de pequeñas cantidades en los alimentos tiene efecto demostrado en la reducción de las enfermedades crónicas en modelos animales. El número de estudios en humanos, para investigar los efectos protectores de los polifenoles, ha aumentado rápidamente en la última década, sin embargo, los estudios epidemiológicos son limitados y las investigaciones clínicas insuficientes (Asensi y col., 2011, Williamson y Carughi, 2010).

4.1. Efecto antioxidante

La principal propiedad de los polifenoles es su **actividad antioxidante**, con numerosos trabajos que inciden sobre ello, no en vano son los antioxidantes más abundantes en la dieta. Esta propiedad depende del estado de hidroxilación de sus anillos aromáticos (de Kok y col., 2008). Entre los efectos antioxidantes de los polifenoles se incluyen los siguientes: (a) eliminación de radicales libres (Manach y col., 2004), (b) quelación y estabilización de cationes divalentes, y (c) modulación de enzimas antioxidantes endógenas (Manach y col., 2004, Soobrattee y col., 2006). Debido a que los polifenoles son compuestos sensibles a la óxido-reducción (Ju y col., 2007), dependiendo del tipo de célula, dosis, y / o el tiempo de tratamiento, también pueden actuar como agentes pro-oxidantes, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, reducir el crecimiento celular (Ramos, 2008).

Hay experimentos clínicos que han demostrado que los polifenoles disminuyen los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por *Reactive Oxygen Species*)

(Fenercioglu y col., 2010), concretamente flavonoides tales como quercetina o catequina pueden capturar directamente ROS, tales como O_2 , H_2O_2 o $HClO$ (Binsack y col., 2001). Como se ha mencionado, los polifenoles también pueden potenciar los sistemas de desintoxicación celular, tales como la superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa (Nijveldt y col., 2001, Kolacek y col., 2010), e inhibir las enzimas generadoras de ROS, tales como la xantina oxidasa o la lipoxigenasa (Coulibaly y col., 2011).

La acción antioxidante de los polifenoles se traduce en otras actividades potenciales, como antiinflamatoria, vasodilatadora, antitrombótica, antiapoptótica, o efectos antiaterogénicos (Quinones y col., 2013). Todas estas actividades se pueden ver traducidas en la reducción del crecimiento de ciertas líneas celulares cancerosas, y son cada vez más las investigaciones que atribuyen actividades antitumorales a los polifenoles (Henning y col., 2013, Sak, 2014).

4.2. Actividad antiinflamatoria

La inflamación es una reacción de la microcirculación que se caracteriza por la migración de las proteínas del suero y los leucocitos de la sangre en el tejido extravascular. Esta migración se regula por la liberación secuencial de mediadores vasoactivos y quimiotácticos, tales como histamina, 5-OH-triptamina, moléculas de adhesión, y citocinas tales como $TNF-\alpha$, IL-1, IL-6, IL-10, IL-8, y MCP-1. Estos procesos se acompañan de un aumento de la temperatura local, enrojecimiento, hinchazón, dolor, y pérdida de la función del tejido (Guo y col., 2009).

La actividad antiinflamatoria de los polifenoles está tomando cada vez más importancia, aunque por supuesto no es algo que debe sorprender dada la relación entre estrés oxidativo e inflamación. El estrés oxidativo produce un aumento de enzimas tales como ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LPO), que están implicados en la liberación de factores como interleucinas y quimiocinas. Ya en 2000 se demostró que la quercetina inhibía la expresión de COX-2 en estudios *in vitro*, o que la flavina presente en el té negro suprimía la expresión de la ciclooxigenasa en células de cáncer de colon (Lu y col., 2000).

La regulación de la inflamación mediante la acción sobre el factor nuclear kappa beta (NF- κ B), que regula el proceso inflamatorio mediante la modulación de la expresión de genes proinflamatorios, es otra diana importante por parte de los polifenoles. Éstos pueden bloquear la fosforilación de la subunidad P65 impidiendo la transcripción de los genes proinflamatorios. En este sentido han mostrado actividad varios polifenoles como el resveratrol, la quercetina o el epigallocatequín galato entre otros (Ran y col., 2008, Ou y col., 2006, Dryden y col., 2006).

La asociación entre inflamación y cáncer ha sido establecida por numerosos estudios epidemiológicos y clínicos (Thun y col., 2004), y los principales agentes implicados son NF- κ B, $TNF-\alpha$ y COX-2, desde la iniciación de la inflamación hasta mecanismos ya citados como la proliferación celular, el efecto antiapoptótico, la angiogénesis o la metástasis (Lu y col., 2006).

A modo de resumen, en la **Tabla 2** puede verse el efecto de los principales polifenoles de la dieta sobre las respuestas inflamatorias.

4.3. Inducción de la detención del ciclo celular

El ciclo celular está altamente regulado, interviniendo gran cantidad de agentes como ciclinas (ciclina A, B, D o E), quinasas dependientes de ciclina (CDK) (CDK 1, 2, 4, ó 6), e inhibidores de CDK. Como es obvio la alteración de cualquiera de estas proteínas por parte de los polifenoles puede afectar el crecimiento y proliferación de las células cancerosas (Ramos, 2008). En la **Tabla 2** se muestran algunos efectos de los polifenoles en el ciclo celular.

4.4. Apoptosis

La muerte celular programada (apoptosis) es un mecanismo de protección contra el cáncer, mediante la eliminación de las células dañadas. Dada la resistencia a la apoptosis típica del cáncer, la inducción de la apoptosis puede considerarse como uno de los objetivos más importantes en el tratamiento (Johnson, 2002).

Muchos polifenoles quimiopreventivos dietéticos, incluyendo quercetina, EGCG, apigenina, crisina, la curcumina, el ácido elágico, y el resveratrol, deben su efecto inhibidor sobre la carcinogénesis a través de la inducción de la apoptosis (Manson, 2003).

Por otra parte, los polifenoles ejercen un efecto diferente sobre el medio oxidativo de células cancerosas y normales, ya que podrían modificar el sistema redox de las células cancerígenas, siendo más pronunciados los efectos citotóxicos de los cancerígenos en las células tumorales que en las células normales (Yang y col., 1998).

Hay 3 vías principales para iniciar la apoptosis (Reuter y col., 2008):

- a) Extrínseca, mediada por receptores de muerte como CD95/Fas/Apo1, factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).
- b) Intrínseca, en las mitocondrias, regulada por gran cantidad de proteínas de la familia de Bcl (Bcl-2, Bcl-xL y Bcl-w), que ejercen efectos anti-apoptóticos, y Bid, Bad, Bak, Bax o Bim, con efectos pro-apoptóticos.
- c) Vía del estrés del retículo endoplasmático (Garcia-Maurino y col., 2012).

La **Tabla 2** recoge el efecto de los polifenoles sobre estos mecanismos.

Tabla 2. Efecto de algunos polifenoles sobre la proliferación e inflamación, el ciclo celular y la apoptosis.

| Polifenol | Proliferación e inflamación | Ciclo celular | Apoptosis |
|---------------|---|--|---|
| EGCG | ↓PI3K, ↓COX-2; ↑JNK, ↓AMPK, TNF- α | ↓ciclina D,E; ↓CDK1,2,4,6; ↓PCNA | ↑ROS, ↑caspasa 3,8,9; ↑citocromo c; ↑↓Bcl-2 |
| Genisteína | ↓AKT; ↓ERK; ↓NF κ B; ↓COX-2 | ↓ciclina B1; ↓Cdc2; ↓PCNA | |
| Ácido Elágico | | ↓ciclina A,B1,E; ↑p53 | ↑caspasa-3,9; ↑citocromo c. |
| Punicalagina | ↓AKT; ↓NF κ B; ↓COX-2 | ↓ciclina A, B1,E | |

| | | | |
|---------------------|-------------------------------|----------------------------|--|
| Curcumina | ↓AKT; ↓mTOR; ↓NFκB; ↓COX-2 | ↓ciclina A; ↓CDK1; ↑p21 | ↑caspasa-3,7,8,9; ↓Bcl-x _L |
| Quercetina | ↓PI3K, ↓↑ERK; ↓↑JNK | ↑p53 | ↑caspasa-3,7,8,9; ↑Bax |
| Apigenina | ↓AKT; ↓Ras; ↓ MEKK1 | | = caspasa-3 |
| Manguiferina | ↑JNK; ↑PKC; ↓COX-2, ↑ICAM1 | | ↑caspasa-3 |
| Flavona | ↓NFκB; ↓COX-2 | ↓ciclina B,C,E; ↓Cdc2 | ↓Bcl-x _L ; ↑Bak |

4.5. Actividad anti cáncer

Son muchos los estudios en diferentes líneas celulares, modelos animales, y ensayos epidemiológicos en humanos, los que sugieren un papel protector de los polifenoles contra distintos tipos de cáncer (Watson y col., 2000, Wenzel y col., 2000, Yang y col., 2001). Diversos ensayos clínicos intentan correlacionar la ingesta de polifenoles con la prevención de un cáncer en particular, mostrando la disminución del riesgo (Arts y col., 2002, Key y col., 1999, Knekt y col., 1997, Su y Arab, 2002). Sin embargo, también hay ensayos donde no se ha encontrado una relación entre la ingesta de polifenoles y la reducción del riesgo (García y col., 1999, Arts y col., 2001). Las mayores evidencias de los efectos beneficiosos de los polifenoles provienen de ensayos en animales y de ensayos *in vitro*. En la **Tabla 3** se recogen algunos estudios que han evaluado la eficacia de los polifenoles en animales.

Tabla 3. Efecto de polifenoles en diversos modelos animales.

| Polifenol | Animal | Cáncer | Efecto |
|---------------------|---------------|---------------|---------------------------------|
| Quercetina | Rata | Colon | ↓ Proliferación celular criptas |
| Resveratrol | Ratón | Neuroblastoma | ↑Supervivencia |
| | Rata | Cerebro | ↑Apoptosis, ↓Proliferación |
| Polifenon B | Hamster | Boca | Proliferación, apoptosis |
| Genisteína | Ratón | Cerebro | ↑Proliferación |
| EGCG | Ratón | Piel | ↓Proliferación |
| | Ratón | Pulmón | ↓Metástasis |
| Curcumina | Rata | Hígado | ↓PCNA, NFκB, ↑p53 |
| Ácido tánico | Rata | Próstata | ↓Tumores, PCNA |

La actividad anticancerígena de estos compuestos debe atribuirse a la combinación de sus efectos protectores sobre células normales y a sus efectos citotóxicos

sobre las células neoplásicas. Además los diferentes efectos dependerán del tipo de tejido, del tipo celular, así como de la dosis ensayada.

4.6. Efectos antiangiogénicos y antimetastático

La metástasis implica la integración de la degradación de la matriz extracelular, la proteólisis, la adhesión celular, la migración celular, la angiogénesis y la invasión. Los compuestos fenólicos poseen efectos antiangiogénicos y antimetastáticos pero los mecanismos moleculares aún no están del todo esclarecidos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Efecto de algunos polifenoles en mecanismos de angiogénesis y metástasis.

| Polifenol | Inhibición angiogénesis | Inhibición metástasis |
|---------------|--|----------------------------------|
| Ácido Elágico | ↓PDGFR; ↓VEGFR ↓HIF-1 α ; ↓VEGF | |
| EGCG | ↓VEGF; ↓FGF | ↓MMP-2,9; ↓FAK; ↓vimentina; ↓HuR |
| Genisteína | | ↓uPA; ↓uPAR; ↑PAI |
| Antocianinas | ↓VEGF | ↓uPA; ↓MMP9 |
| Quercetina | ↓VEGF; ↓I-CAM1 | ↓FAK; ↓MMP2,9 |
| Apigenina | ↓VEGF; = HIF-1 α | ↓MMP2,9 |
| Curcumina | | ↓MMP1,2 |
| Luteolina | ↓VEGF | ↓MMP2,9; ↓FAK |

4.7. Efectos antiproliferativos

Kuntz et al. (1999) demostraron la actividad antiproliferativa de 30 polifenoles, de los 36 ensayados, sin citotoxicidad celular en células de cáncer humano. Las principales vías de señalización relacionadas implican a fosfoinositol 3-quinasa, proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), y sobre todo al factor nuclear κ B (NF- κ B). La inhibición de la activación de NF- κ B es un objetivo clave en la quimioprevención dada su activación constitutiva en casi todos los tipos de cáncer (Colgate y col., 2007).

4.8. Efectos de los polifenoles en el cáncer de colon

El CCR tiene una especial relación con los compuestos polifenólicos, respecto a otros tipos de cáncer, pues es en el tracto intestinal donde aquellos proporcionados por la

dieta ejercen efectos quimiopreventivos, entre otros motivos porque es donde están a las concentraciones más altas (Hu, 2011).

En la **Tabla 5** se recogen algunos de los efectos de los principales polifenoles en distintas líneas celulares de colon.

Tabla 5. Efecto de polifenoles en líneas de cáncer de colon.

| Polifenol | Tipo celular | Mecanismo celular |
|---------------------|--|--|
| Quercetina | HT-29, Caco-2, SW480, HCT-116, IEC-6, FHC, VACO-235, COLO 201, LS-174T, T84, DLD-1, LT97 | Inhibición del crecimiento celular y la actividad citotóxica; reducción o la estimulación de proliferación celular; disminución de la migración celular; inducción de detención del ciclo celular, apoptosis, y autofagia. |
| Rutina | HT-29 , Caco-2 | La inhibición o ninguna alteración de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis. |
| Miricetina | HT-29, Caco-2, SW480, T84, VACO-235, COLO 205 | Inhibición del crecimiento celular; reducción de la proliferación celular; inducción de apoptosis. |
| EGCG | HT-29, Caco-2, SW480, SW837, SW426, HCT-116, FHC, T84 | Inhibición del crecimiento celular, proliferación, transformación neoplásica, invasión y angiogénesis; inducción de detención del ciclo celular y apoptosis. |
| Catequina | HT-29 | Actividad inhibidora del crecimiento y la apoptosis |
| Epicatequina | HT-29 | Actividad inhibidora del crecimiento y la apoptosis |
| Resveratrol | HT-29, SW480, Caco-2, SW620, HCT-116, CCL 220.1, WiDr | Inhibición del crecimiento celular; inducción de poptosis; detención de proliferación y transformación neoplásica |

5. SIRTUÍNAS

Las sirtuínas son histonas desacetilasas tipo III, ampliamente distribuidas en la naturaleza, con demostradas implicaciones en procesos como la inflamación, senescencia celular, diferenciación celular y el metabolismo. En mamíferos encontramos 7 tipos de sirtuinas, que se diferencian principalmente en la localización intracelular y en el sustrato, y por tanto en la función asociada. **Tabla 6.** (Chung y col., 2010).

Tabla 6. Localizaciones, sustratos biológicos, y funciones de las sirtuínas presentes en mamíferos.

| Sirtuína | Localización intracelular | Sustrato | Función |
|--------------|---------------------------|-------------------------------------|---|
| Sirt1 | Núcleo y citoplasma | NF-κB, p53, FOXO | Supervivencia celular, diferenciación celular, inflamación, metabolismo |
| Sirt2 | Citoplasma | α-tubulina, histona H4 | Ciclo celular |
| Sirt3 | Núcleo y mitocondria | Acetil-CoA sintetasa | Metabolismo |
| Sirt4 | Mitocondria | ADP ribosil transferasa | Metabolismo |
| Sirt5 | Mitocondria | Proteína mitocondrial | Función mitocondrial |
| Sirt6 | Núcleo | ADP ribosil transferasa, histona H3 | Reparación ADN |
| Sirt7 | Núcleo | ARN polimerasa I | Transcripción ARNr |

La sirtuína mejor caracterizada es SIRT1, ortólogo de Sir2 (*silent information regulation 2*) de levaduras, que juega un papel importante en la regulación de la patogénesis de enfermedades pulmonares crónicas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades renales y patologías cardiovasculares crónicas (Michan y Sinclair, 2007, Finkel y col., 2009). Además, Sir2 se describió como un gen responsable del incremento de la longitud de vida; hasta en un 70% en levaduras y *Caenorhabditis elegans* (Howitz y col., 2003, Tissenbaum y Guarente, 2001, Morselli y col., 2010, Burnett y col., 2011).

El mecanismo de regulación de SIRT1, o Sir2, se debe a su capacidad de desacetilar tanto histonas como proteínas no histonas (Camins y col., 2010). Las sirtuínas, para realizar la reacción de desacetilación, requieren nicotinamida adenina dinucleótido (NAD⁺) como cofactor. De esta manera, eliminan el grupo acetil de las proteínas transfiriéndoselo a NAD⁺. En este proceso se generan dos metabolitos, la 2'-O-acetil-ADP-ribosa y la nicotinamida (NAM). La actividad de las sirtuínas puede ser inhibida por el producto de reacción NAM. En mamíferos, NAM puede ser convertida

en NAD^+ en dos pasos enzimáticos. Primero, se transforma en nicotinamida mononucleótidos (NMN), por la enzima nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT), y posteriormente pasa a NAD^+ por la enzima nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa (NMNAT) (**Figura 3** (Chung y col., 2010)).



Figura 3. Transformación de nicotinamida en NAD^+ mediante la participación de las enzimas nicotinamida fosforibosiltransferasa y nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa.

Algunos de los procesos en los que las sirtuínas están involucradas incluyen:

- **Inflamación:** SIRT1 se asocia directamente con RelA/p65 (subunidad de NF- κ B) por desacetilación del residuo lys310, regulando la transcripción de los genes asociados a NF- κ B, muchos de ellos pro-inflamatorios (Chen y col., 2002). Además, recientes estudios han demostrado que SIRT1 también desacetila, e inactiva, a la proteína activadora AP-1, lo que conlleva a un descenso de COX-2 (Zhang y col., 2010).

Diversos ensayos *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que el silenciamiento de SIRT1 produce un incremento en la activación de NF- κ B y de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β o IL-6 (Yoshizaki y col., 2009), mientras que con activadores de sirtuínas el factor de transcripción está inhibido. Además se ha encontrado como en distintas patologías inflamatorias los niveles de sirtuínas estaban disminuídos (Yang y col., 2007, Shen y col., 2009). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la reducción de expresión y la actividad de SIRT1 en condiciones inflamatorias no se conocen (Xie y col., 2013).

- **Longitud de vida:** la restricción calórica es el mecanismo mejor conocido relacionado con el incremento de la longevidad. Se ha propuesto que el efecto del resveratrol en *C. elegans*, en mosca, en levadura, y en humanos es a través de una vía sirtuínas-dependiente. La administración de este compuesto incrementa los niveles de SIRT1, y el ratio NAD^+/NADH , disminuyendo los niveles de NAM (Fulco y col., 2008).

En este sentido, parece ser fundamental el mecanismo de regulación de SIRT1 y LKB1/AMPK. Se ha propuesto que SIRT1 y AMPK están correguladas entre ellas a lo largo del ciclo celular, y que los niveles de NAD/NADH y ADP/ATP son fundamentales en esta regulación (Wang y col., 2011).

- **Cáncer:** las sirtuínas tienen un papel controvertido en procesos de cáncer. Se ha visto que los niveles de SIRT1 están incrementados en algunos tipos de cáncer. Además hay evidencia de la implicación de SIRT1 en el silenciamiento epigenético de genes supresores de tumores tales como SFRP1, CDH1, donde la inhibición de SIRT1 llevara a la re-expresión de estos genes silenciados con implicaciones potenciales para el desarrollo de tumores (Pruitt y col., 2006). Pero por otro lado, hay estudios donde ratones transgénicos de SIRT1 desarrollan tumores, asignando un papel promotor de tumores a la enzima. Esto podría deberse a la desacetilación, y por tanto inactivación, de p53. (Chung y col., 2010).

- **Autofagia:** asociado a la regulación negativa de mTOR por parte de sirtuínas. El resveratrol reduce la actividad de mTOR de una manera sirtuína-dependiente. Además, se ha descrito que SIRT1 desacetila Atg5, Atg7 y Atg 8 (pro-autofágicos). La ruta SIRT1-LKB1-AMPK debe estar muy involucrada en la regulación de la autofagia (Wang y col., 2011).

5.1. Polifenoles como activadores de sirtuínas

Hay numerosos estudios que muestran como el aumento de polifenoles en la dieta protege frente a enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inflamatorias y metabólicas, además de tener un papel algo más cuestionado en algunos cánceres, todo ello aumentando la actividad desacetilasa de sirtuína 1.

El resveratrol fue el primer compuesto polifenólico del que se demostró que activaba SIRT1 (Baur y Sinclair, 2006). Además, hay numerosos estudios que indican el papel de los polifenoles en numerosas patologías a través de sirtuínas. Por citar algún caso, están la quercetina o curcumina que también activan SIRT1 de mamífero aunque en menor medida en comparación con resveratrol (Davis y col., 2009, Sun y col., 2014). Sin embargo no todos los polifenoles activan sirtuínas *in vivo*. Se ha encontrado que algunos de ellos (como el epigallocatequín galato y la quercetina) generan catabolitos que no activan, o incluso pueden inhibir, a SIRT1 (de Boer y col., 2006).

Actualmente se han descrito numerosos compuestos activadores de SIRT1 en mamíferos, siendo la mayoría análogos de resveratrol. Quizás el activador más potente es SRT1720, que es 800-1000 veces más eficaz que el resveratrol aunque constantemente aparecen nuevas moléculas derivadas activadoras de sirtuínas (Bemis y col., 2009, Mellini y col., 2014).

Es importante señalar que no todos los efectos beneficiosos de los polifenoles derivan de su interacción con sirtuínas. En ese sentido la actividad del resveratrol ha sido la más discutida, demostrándose que no es un activador específico de SIRT1. El resveratrol tiene muchas actividades biológicas independientes de sirtuínas (Behr y

col., 2009). Incluso hay autores que afirman que su efecto sobre SIRT1 puede no ser directo, sino, por ejemplo, derivado de la activación de AMPK (Park y col., 2007). Además muchos de los análogos que han ido apareciendo, como SRT1720, SRT2183, SRT1460 no son específicos para la activación de SIRT1 (Pacholec y col., 2010).

Por lo tanto, el conocimiento o desarrollo de un activador exclusivo de sirtuínas, ya sea o no un polifenol, es crucial para entender el papel de estas enzimas en la función celular y la posterior aplicación de esos activadores en el tratamiento de patologías.

5.2. Relación sirtuínas/AMPK/autofagia

La autofagia es un proceso de mantenimiento celular altamente conservado. Descrito inicialmente en levaduras en condiciones de restricción nutricional (Takeshige y col., 1992, Huang y Klionsky, 2002), opera también en eucariotas superiores (Kim y Klionsky, 2000, Fimia y Piacentini, 2010). Además de tener una función básica en la eliminación y reciclaje de componentes dañados, tiene un papel fundamental en situaciones de daños causados por agentes agresivos, endógenos o ambientales, y por patógenos. En estas circunstancias, aumenta enormemente la cantidad de moléculas y elementos celulares dañados, y una adecuada renovación de los mismos es crítica para la recuperación de la homeostasis celular. En este sentido, si la autofagia no funciona adecuadamente, este defecto contribuye a la cronificación de los procesos inflamatorios. El gran interés que se está prestando a la autofagia en humanos en los últimos años deriva de la relación entre alteraciones de la autofagia y diversas enfermedades, como enfermedades degenerativas (Cheung y Ip, 2011), enfermedad inflamatoria intestinal (Huett y col., 2010) y muchos tipos de cáncer (Cuervo, 2004, Morselli y col., 2009).

El proceso se inicia cuando el material que va a ser descartado es rodeado por una membrana, ocasionando la formación del denominado autofagosoma. Dicho orgánulo se fusiona con un lisosoma, formándose un autolisosoma. Las enzimas hidrolíticas del lisosoma degradan el contenido del autolisosoma, y los constituyentes básicos de los elementos degradados se liberan al citosol para su reciclaje (Yang y Klionsky, 2009). En levaduras se han descrito más de 30 genes relacionados con la autofagia (denominados con el acrónimo *ATG*) (Klionsky y col., 2003). Entre las proteínas *Atg*, hay dos sistemas *ubiquitin-like* que son necesarios para un funcionamiento correcto de la dinámica de membranas a lo largo del proceso (Yang y Klionsky, 2010): el sistema *Atg12* y el sistema *LC3 (microtubule-associated proteína 1 light chain)*. La forma de *LC3*-conjugada con fosfatidiletanolamina (PE) se denomina *LC3-II*, y se localiza en la membrana del autofagosoma. Puesto que *LC3-II* es un marcador de la formación de autofagosomas, su monitorización es uno de los métodos más usados para la detección y seguimiento de la autofagia (Klionsky y col., 2008). Entre las restantes proteínas *Atg*, hay que destacar *Atg1* y *Atg6*. Los complejos formados por *Atg1* controlan las fases iniciales de la formación del fagosoma, y están regulados negativamente por la proteína *TOR (target of rapamycin)*, sobre la que se habla más adelante. La proteína *Atg6* recibe el nombre *Beclin1 (Bcl-2 interacting coiled-coil protein 1)* en mamíferos (Funderburk y

col., 2010). Esta proteína forma complejos que controlan la producción de señales derivadas de fosfoinosítoles, que facilitan el ensamblaje del fagosoma incipiente, y que son regulados de forma negativa por proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Wei y col., 2008). Un esquema del proceso de la autofagia, incluyendo a las distintas proteínas Atg, se muestra en la **Figura 4**.

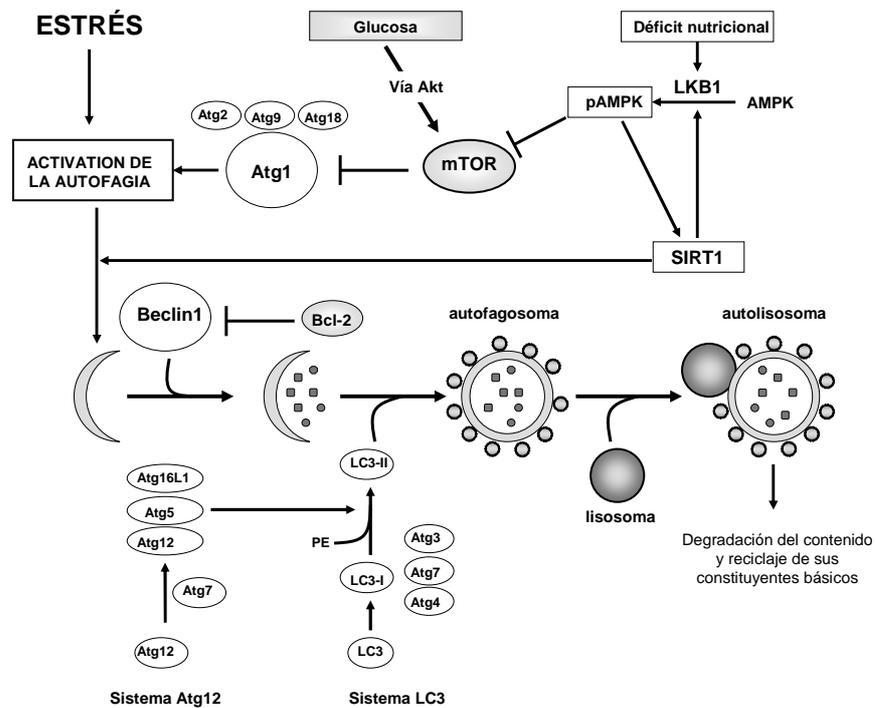


Figura 4. Representación esquemática de la autofagia en mamíferos. También se muestran algunos elementos claves de la regulación: la vía Akt, AMPK, mTOR, Bcl-2 y sirtuínas (SIRT). Las interacciones positivas se muestran como flechas; las interacciones negativas como líneas truncadas

La proteína TOR (*Target of Rapamycin*) es una proteína-quinasa que representa el punto de convergencia de varias vías, y que se considera el principal regulador negativo de la autofagia (Jung y col., 2009). En mamíferos, mTOR integra señales que inhiben la autofagia a través de la vía PKB (clase I fosfatidilinositol 3-quinasa-proteín-quinasa B), también conocida como vía Akt (Inoki y col., 2002). Por otro lado, en mTOR convergen también otras vías activadoras de la autofagia, como las dependientes de la activación de la AMPK (*AMP-dependent kinase*).

La AMPK es un punto clave en la regulación del estado energético celular. Se activa por fosforilación, realizada por la proteína-quinasa LKB1 o por otras quinasas. La AMPK activa (pAMPK) inhibe mTOR (Shaw, 2009), y, por tanto, activa la autofagia.

La actividad deacetiladora de las sirtuínas aumentan la actividad de LKB1 (Lan y col., 2008), contribuyendo a que aumente la cantidad de pAMPK. Por otro lado, pAMPK aumenta la actividad de SIRT1, por lo que existe una estrecha interconexión entre

autofagia, AMPK y sirtuínas. Además, la dependencia de NAD^+ que tienen todas las sirtuínas establece una conexión entre su actividad y el estado energético celular, y las convierte en elementos claves en la adecuación del metabolismo al estado redox de la célula.

6. CAENORHABDITIS ELEGANS

En nuestras investigaciones hemos utilizado *C. elegans* como modelo para probar el efecto de polifenoles y su relación con las sirtuínas. La puesta a punto de las técnicas con el nematodo se ha realizado gracias a colaboraciones con el Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica de la Universidad Pablo de Olavide y con la empresa biotecnológica Bionaturis.

Se trata de un modelo muy extendido en investigaciones genéticas dada la posibilidad de crear mutantes con relativa facilidad. En farmacología su uso no estaba muy extendido aunque en los últimos años ha tomado cierto interés en la búsqueda de nuevos fármacos (Artal-Sanz y col., 2006). Y es que son varias las ventajas que el uso de este modelo puede aportar frente al uso de otros estudios *in vivo* como roedores. A modo de resumen pueden encontrarse algunas de ellas en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Comparativa entre modelo *in vivo* usando rata/ratón frente a *C. elegans*.

| | Rata / Ratón | <i>C. elegans</i> |
|---------------------------|---|-----------------------|
| n | < 20 por grupo | > 100 |
| Precio mutante | Ejemplo: > 50€ 1 ratón IL-10 ^{-/-} | < 10 € cepa |
| Cantidad compuesto | Gramos | Miligramos |
| Administración | Sonda oral, en dieta, en agua | En el medio |
| Tiempo | Varias semanas o meses | Varios días o semanas |

6.1. Características biológicas

Caenorhabditis elegans, antiguamente llamado *Rhabditis elegans*, es un nematodo redondo, no parásito, de vida libre, que vive normalmente en el suelo, en todo el intervalo de temperatura de las regiones del mundo, alimentado de microorganismos como bacterias y hongos. Para su cultivo necesita un ambiente húmedo, oxígeno atmosférico y una temperatura ambiental entre 10 y 25°C y una fuente de alimento, generalmente *Escherichia coli*.

A pesar de su sencilla anatomía, el animal muestra un gran repertorio de comportamiento, incluyendo la locomoción, alimentación, defecación, puesta de huevos, formación larvas, y respuestas sensoriales al tacto, el olfato, el gusto y la temperatura,

además de algunos comportamientos complejos como apareamiento masculino, el comportamiento social, y el aprendizaje (de Bono, 2003, Rankin, 2002). Los adultos tienen solamente alrededor de 1 mm de longitud y 70 μm de diámetro con un cuerpo transparente que facilita su manipulación y observación, siempre bajo un microscopio confocal. *C. elegans* también pueden soportar las duras condiciones ambientales por el cambio a una etapa denominada larva dauer que puede sobrevivir cuatro a ocho veces la vida útil de 3 semanas normal (Cassada y Russell, 1975).

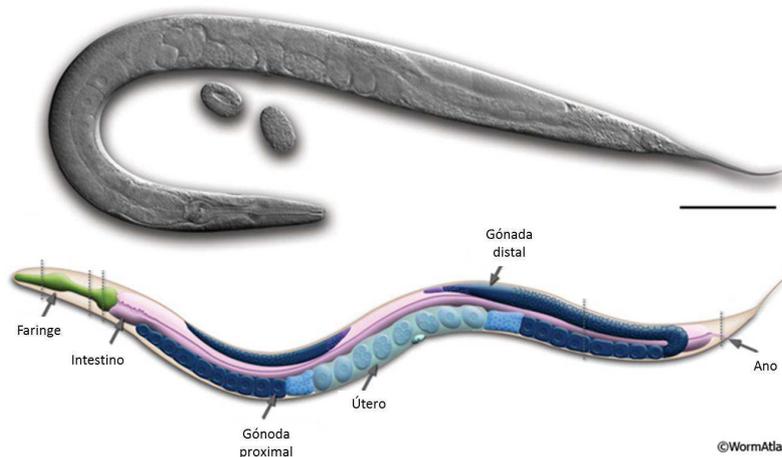


Figura 5. Fotografía y representación esquemática del cuerpo de *C. elegans*

Es hermafrodita autofertilizante, aunque también existe la forma de macho, lo que hace posible cultivarlo en el laboratorio en grandes cantidades, tanto en medio líquido como en placas de agar. La capacidad reproductiva es alta generando numerosos descendientes en poco tiempo, por lo que el control de las generaciones es clave sobre todo en experimentos relacionados con la longevidad. El ciclo de vida completo se completa en 3 días (**Figura 6**).

El tamaño del genoma de *C. elegans* es de 97 millones de pares de bases, unas 20 veces más grande que el de *E. coli* y aproximadamente un 1/30 del humano. Consta de 6 cromosomas con un total de unos 20.000 genes. Fue el primer organismo multicelular para el que fue completamente secuenciado su genoma, en 1998 (totalmente completado en el 2000). Se pueden obtener mutantes fácilmente por mutagénesis química o la exposición a la radiación ionizante (Anderson, 1995, Jorgensen y Mango, 2002). Las cepas se pueden mantener congeladas durante largos períodos de tiempo.

6.2. Ciclo de vida

Una de las ventajas de *C. elegans* es que tiene un corto ciclo de vida aunque es importante señalar que la duración del mismo dependerá de la temperatura ambiental. Desde huevo a un adulto capaz de producir más huevos transcurren 3,5 días a 20 °C, con un intervalo que oscila entre 2,5 días a 25 °C hasta 6 días a 15 °C (Byerly y col., 1976). La puesta de huevos se produce a lo largo de un periodo de 4 días y cesa alrededor del quinto días.

El promedio de vida varía con la temperatura. Se ha descrito una longevidad de 9 días a 25,5 °C y de 35 días a 10 °C) (Gems y Riddle, 2000). Se ha observado que

reduciendo la concentración de bacterias se puede elevar la longevidad de 16 a 26 días (20 °C), a la vez que se reduce el periodo de fecundidad y el tamaño de la camada (Cypser y col., 2013). Tras la embriogénesis (periodo desde la fertilización a la puesta de huevos) se genera el primer estadio larvario (L1), con una estructura general similar al adulto, aunque más pequeño (250 μm de longitud). El desarrollo post-embriionario implica el crecimiento a través de 4 estadios larvarios (desde L1 a L4) antes de que la muda final produzca el adulto. A 20 °C la embriogénesis dura 14 h, y los estadios larvarios se van sucediendo en las siguientes horas.

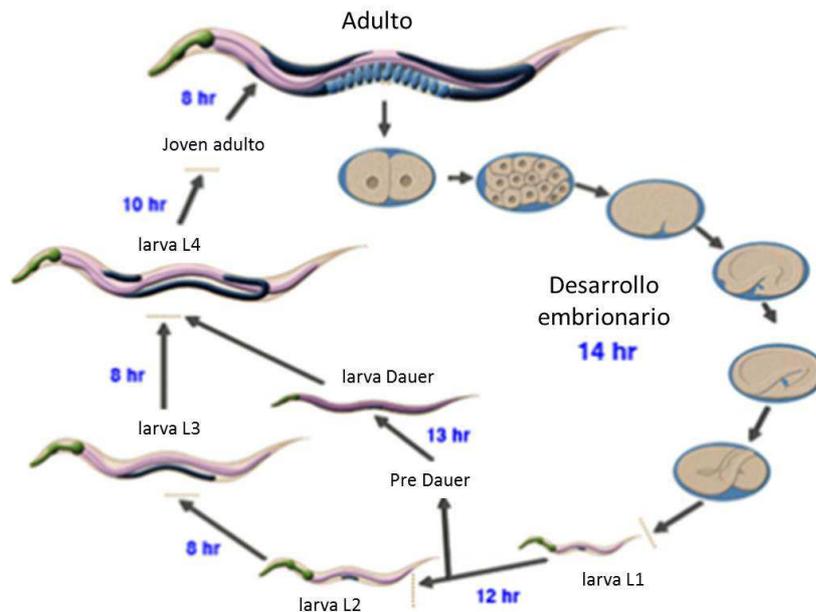


Figura 6. Esquema del ciclo de vida de *C. elegans*

La concurrencia de ausencia de alimento y una densidad poblacional suficientemente alta a temperatura de 20 °C conduce a un estado alternativo, denominado *dauer*, formado en la segunda muda, que es morfológicamente distinto de la larva desarrollada en buenas condiciones. Presenta una cutícula distinta y su orificio oral está cerrado por un tapón interno con la su faringe estrangulada de forma que no realiza bombeo. El gusano en estado *dauer* está especializado para sobrevivir en condiciones adversas, como desecación. Puede permanecer viable varios meses y cuando el alimento comienza a estar disponible, muda para llegar a larva normal L4 (Cassada y Russell, 1975).

6.3 Sexo

Existen dos formas sexuales, macho y hermafrodita, siendo esta última la predominante. Los hermafroditas producen esperma y ovocitos y pueden reproducirse por autofertilización, sin apareamiento. El macho produce solo esperma y para reproducirse debe aparearse con un hermafrodita. Después del apareamiento, el esperma del macho compete con el propio esperma del hermafrodita en la fertilización de los ovocitos y la mayoría de la progenie es luego resultado de la fertilización cruzada. Un hermafrodita simple produce aproximadamente una progenie de 300 individuos hermafroditas por autofertilización, mientras que la fertilización cruzada puede producir

más de 1000 gusanos machos y hermafroditas en proporciones iguales. La autofertilización conduce a homocigocidad de alelos, por lo tanto gusanos individuales que pueden considerarse genéticamente idénticos (Hansen y Pilgrim, 1999).

6.4. Anatomía

El gusano hermafrodita adulto posee 959 núcleos de células somáticas, 302 de las cuales son nerviosas. El número de células somáticas es algo menor que el de los núcleos, ya que algunas células son multinucleadas. El gusano masculino adulto, por su parte, posee 1031 células y cuenta con 79 células nerviosas extra en relación al hermafrodita, pudiendo estar la diferencia en el sistema nervioso entre ambos sexos relacionada con el comportamiento sexual.

Ambos sexos tienen la misma anatomía general y son de tamaño similar, con el macho adulto ligeramente más pequeño y delgado que el hermafrodita. La boca está en la punta de la cabeza, mientras que el ano del hermafrodita y la cloaca del macho son ventrales en el extremo posterior. En contraste a la simple punta de la cola del hermafrodita, la cola del macho es una estructura elaborada con musculatura compleja y nervios asociados necesarios para el apareamiento. La distinción entre ambos sexos se realiza en base a las diferencias en la cola.

La hipodermis, que segrega la cutícula, se compone una serie de anillos concéntricos de cinco células sincitiales más pequeñas en la cabeza, y tres mononucleadas y una célula sincitial en la cola.

Las células del sistema nervioso se organizan en los ganglios en la cabeza y la cola. La mayoría de neuronas de *C. elegans* se encuentran en la cabeza alrededor de la faringe. En el cuerpo, una fila continua de los cuerpos celulares de las neuronas recorre el organismo. Además, hay dos pequeños ganglios posteriores en los lados, así como algunas neuronas dispersas a lo largo del cuerpo. El sistema nervioso coordina el comportamiento rutinario y responde a estímulos medioambientales

Las neuronas y la hipodermis se separan de la musculatura por una lámina basal delgada. Las células musculares de la pared del cuerpo son estriadas dispuestas a lo largo de toda la longitud del nematodo. En la faringe, alrededor de la vulva, el intestino y el recto hay músculos no estriados.

El sistema digestivo consta de una faringe y un intestino, que se extiende desde la cabeza hasta la cola y se observa sin dificultad al microscopio por la transparencia del animal. La faringe está compuesta de 20 células musculares, 20 células nerviosas y 18 células epiteliales y está encerrada en una membrana base. A través de contracciones musculares coordinadas, la faringe es la responsable de la ingestión de bacterias. El intestino es un tubo grueso de estructura aparentemente sencilla, con 20 células simples organizadas en 9 anillos. Cuatro células situadas en la parte ventral conforman el sistema excretor, con funciones en la osmorregulación y eliminación de residuos. El sistema excretor se abre al exterior a través del poro excretor (Kenyon, 1988).

6.5. *Caenorhabditis elegans* como organismo modelo en estudios con polifenoles.

En los últimos años, diversos grupos de investigación han comenzado a utilizar el nematodo *C. elegans* como organismo modelo para desarrollar estudios *in vivo* con distintos fitoquímicos. Como ya se ha visto, se trata de un modelo con múltiples posibilidades, que ofrece una serie de ventajas respecto a otros modelos animales. Es el animal multicelular mejor caracterizado a nivel genómico, embriológico, neurobiológico y celular. Su fácil manejo, su bajo coste y su ciclo de vida corto permiten la rapidez y facilidad de trabajo de un microorganismo, pero con las ventajas de un modelo animal real.

En la actualidad existe un creciente interés particular en el conocimiento de las actividades y mecanismos de acción de los compuestos polifenólicos. Sin embargo, los estudios llevados a cabo con este fin en el modelo *C. elegans* son escasos, y se relacionan básicamente con la influencia de los polifenoles sobre longevidad y resistencia al estrés oxidativo, aunque generalmente sin profundizar demasiado en los mecanismos moleculares (Saul y col., 2011, Chen y col., 2013, Guha y col., 2014).

Sirtuínas de *C. elegans*

C. elegans posee 4 sirtuínas, sir2.1, sir2.2, sir2.3 y sir2.4, todas con gran similitud de secuencia con las sirtuínas de mamíferos (Frye, 2000). En la **tabla 8** se puede ver la homología de estas sirtuínas con las de mamíferos.

Tabla 8. Diversidad de proteínas SIR2 en *C. elegans* y su homología con sirtuínas de mamíferos.

| Variante SIR-2 | Función | Sustratos | Homología |
|----------------|---|-----------|-----------|
| SIR-2.1 | Longevidad, regulación cromatina, protección neurodegeneración. | Histonas | SIRT1 |
| SIR-2.2 | Estabilidad genoma, protección frente a neurodegeneración | ? | SIRT4 |
| SIR-2.3 | ? | ? | SIRT4 |
| SIR-2.4 | ? | ? | SIRT6 |

Hasta el momento, se sabe relativamente poco acerca de las funciones de las sirtuínas de *C. elegans*. La gran mayoría de los estudios se han centrado en el papel de SIR-2.1 que es la más cercana evolutivamente a SIRT1 de mamíferos, ambas nucleares. El gran interés en esta sirtuína en concreto radica en la relación que presenta con mecanismos relacionados con la longevidad (Tissenbaum y Guarente, 2001, Hashimoto y col., 2010). Se ha propuesto que SIR2.1 produce el incremento de la longevidad a través de vías dependiente de DAF-16 (ortólogo de las proteínas FOXO) y mediante mecanismos relacionados con la restricción calórica (Tissenbaum y Guarente, 2001, Wang y Tissenbaum, 2006, Mouchiroud y col., 2011). Además se le han descrito funciones relacionadas con la neuroprotección (Bates y col., 2006, Bizat y col., 2010).

Introducción

SIR-2.2 and SIR-2.3 se han caracterizado como homólogas de SIRT4 de mamíferos y se cree que se encuentran principalmente en la mitocondria. Ninguna de las dos ha mostrado efectos relacionados con la longevidad. De igual manera tampoco se han visto efectos relacionados con la longevidad al sobreexpresar SIR-2.4, que es la evolutivamente más cercana a SIRT6 (Tissenbaum y Guarente, 2001, Mair y col., 2009).

OBJETIVOS

El estudio de productos naturales continúa siendo una parte importante en la investigación de nuevos compuestos que puedan dar lugar al desarrollo de fármacos. De entre todos los fitoquímicos, los polifenoles representan uno de los grupos más estudiados, con una amplia variedad de propiedades, incluyendo efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antitumorales, que los hacen ser compuestos potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades de índole inflamatoria como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), así como en la prevención del cáncer colorrectal.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es valorar el potencial de los polifenoles como activadores de sirtuínas, así como las actividades biológicas derivadas de estos mecanismos, en modelos celulares y animales, incluyendo modelos experimentales de EII y el nematodo *Caenorhabditis elegans*

Este trabajo se ha centrado en los siguientes objetivos:

1. Evaluar el efecto del resveratrol y la quercetina, así como de extractos ricos en polifenoles, tales como un extracto de hojas de mango y un extracto de hojas de uva sobre la expresión de sirtuína 1 en una línea monocitaria de leucemia aguda humana (THP-1) y una línea de adenocarcinoma de colon humano (HT-29).
2. Valorar la capacidad antiinflamatoria de los polifenoles puros y los extractos en una línea monocitaria de leucemia aguda humana transformada a macrófago (THP-1), cuantificando la producción de la citocina TNF- α , así como la actividad citotóxica sobre las líneas celulares HT-29 y THP-1.
3. Investigar los cambios progresivos que se producen en la mucosa intestinal de ratones deficientes en interleucina 10, que con el tiempo pueden desarrollar displasia y cáncer de colon, analizando marcadores de inflamación y carcinogénesis, así como la expresión de sirtuínas y la activación de la autofagia.
4. Valorar el potencial farmacológico de un extracto de hojas de mango mediante un modelo de colitis ulcerosa aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS) y conocer los mecanismos relacionados con su actividad, evaluando su efecto sobre ciertos parámetros inflamatorios, que incluyen las citocinas TNF- α e IL-6 y la enzima COX-2, así como sobre la expresión de sirtuínas y la activación de la cinasa AMPK.
5. Profundizar en el estudio de los efectos de los polifenoles como reguladores de sirtuínas, mediante el modelo basado en *Caenorhabditis elegans*, evaluando:
 - 5.1. El efecto de resveratrol en la acumulación de triglicéridos en el nematodo y la participación de sirtuínas.

Objetivos

5.2. El efecto del extracto de hojas de mango sobre la longevidad del nematodo, y parámetros relacionados con el tamaño corporal y el bombeo faríngeo, investigando nuevamente el papel de sirtuínas en estos efectos.

OBJECTIVES

The study of natural products remains today one of the most promising fields for the discovery of new compounds that may lead to drugs development. Polyphenols are one of the most studied groups, due to their role as antioxidant, antiinflammatory and antitumoral compounds. For this reason, they may be effective therapeutic agents for the treatment of inflammatory pathologies such as inflammatory bowel disease (IBD) and for colon cancer prevention.

The overall objective of this study is to investigate the role of polyphenols as sirtuin activators, and the biological activities derived from this activation, in both cellular cultures and animal models, including IBD models and the worm *Caenorhabditis elegans*.

This work has been focused on the following specific objectives:

1. To evaluate the effect of resveratrol and quercetin, as well as extracts rich in polyphenols, such as mango leaf and grape leaf extracts on the expression of sirtuin 1 in a human acute leukemia monocytic cell line (THP-1) and a human adenocarcinoma colon cell line (HT-29).
2. To evaluate the anti-inflammatory activity of pure polyphenol and extracts on a human acute leukemia monocytic cell line transformed into macrophages (THP-1) by quantifying TNF- α production, as well as their cytotoxic activity on the THP-1 and HT-29 cell lines.
3. To investigate the progressive changes that occur in the intestinal mucosa of interleukin-10-deficient mice, which, with age, may develop dysplasia and adenocarcinoma, analyzing inflammatory and tumor biomarkers as well as sirtuin 1 expression and autophagy activation.
4. To assess the therapeutic potential of a mango leaf extract according to an animal model of acute ulcerative colitis induced by dextran sodium sulfate (DSS) and to understand the mechanisms associated with the activity of extract, evaluating its effects on inflammatory parameters, including the cytokines tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin 6 (IL-6) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme, as well as sirtuin 1 expression and AMPK activation.
5. To further study the effects of polyphenols as regulators of sirtuins, using the *Caenorhabditis elegans* model, evaluating:
 - 5.1. The effect of resveratrol on triglyceride accumulation in the nematode and the participation of sirtuins.
 - 5.2. The effect of the mango leaf extract on the nematode lifespan, as well as on parameters related to the body size and pharyngeal pumping, investigating the role of sirtuins in these actions.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1. Líneas Celulares

1.1.1. Línea celular de adenocarcinoma de colon humano, HT-29

Esta línea celular se obtuvo de la “*European Collection of Cell Cultures*” (ECACC). Las células fueron incubadas a 37 °C y bajo atmósfera con un 5% de CO₂ y alta humedad, en medio McCoy’s 5A sin L-Glutamina (PAA, Austria), suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA) y 100 U/l de Penicilina/Estreptomicina (PAA). Esta línea celular crece adherida a la superficie. Las células individuales se obtuvieron mediante un tratamiento con tripsina-EDTA (PAA) (5 minutos, 37 °C).

1.1.2. Línea celular monocitaria de leucemia aguda humana, THP-1

La línea celular THP-1 fue cedida por el profesor Francisco Muriana del Instituto de la Grasa (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sevilla). Las células se incubaron a 37 °C, y bajo atmósfera con un 5% de CO₂ y alta humedad, en medio RPMI 1640 con L-Glutamina 2 mM y HEPES 25 mM (Gibco, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA) y 100 U/l de Penicilina/Estreptomicina (PAA). Estas células se cultivaron en estado monocitario, presentando un crecimiento en suspensión, o se indujo su diferenciación a macrófagos con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) a 0.2 µM durante 72 h, convirtiéndose en células adherentes. Esta línea no requiere ser tripsinizada.

1.2. Animales de experimentación

1.2.1. Ratones C57BL/6

Las experiencias se realizaron de acuerdo con las Guías Institucionales de la Unión Europea relativas al cuidado y uso de animales de laboratorio (Directiva del Consejo de Europa 86/609/CEE) y fueron revisadas por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

Para los experimentos basados en ratones que desarrollan inflamación crónica que puede derivar a cáncer de colon se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 de 4 semanas de edad suministrados por los laboratorios Charles River (Barcelona), donde fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos durante las 4 primeras semanas de vida. Se dispuso de dos tipos de ratones, los silvestres, que sirvieron como control, y los ratones KO para la interleucina 10 (IL-10^{-/-}).

Del mismo modo, se emplearon ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad, con un peso de 20 gramos aproximadamente, para el modelo de colitis producida por la administración de dextrano sulfato sódico (DDS) en el agua de bebida. En este caso los animales fueron suministrados por los laboratorios Janvier.

En todos los casos, los animales fueron recibidos y realojados en las instalaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, y se mantuvieron en condiciones estándares de estabulación a 24-25 °C, doce horas de luz al día y alimentación controlada.

1.2.2. *Caenorhabditis elegans*

El nematodo, así como las distintas cepas mutantes empleadas del mismo, fueron cedidas por el Doctor Manuel Muñoz Ruíz, del Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica de la Universidad Pablo de Olavide.

2. ESTUDIOS *IN VITRO*

2.1. Sustancias ensayadas

En los experimentos realizados *in vitro* se ensayaron distintos polifenoles adquiridos comercialmente, como el resveratrol (Sigma, USA) o la quercetina (Sigma, USA). Además, se evaluaron dos extractos naturales, suministrados por la empresa española Polifenoles Naturales (Polinat, Las Palmas): un extracto de hojas de mango con que contenía un 60% de manguiferina, y un extracto de hojas de uva con más de un 90% de dehidroquercetina.

Estas sustancias se ensayaron a diferentes concentraciones, calculadas en términos de molaridad para los compuestos puros y de miligramos por mililitro para los extractos. La concentración más alta estudiada en las células fue de 100 μM o 100 $\mu\text{g/mL}$. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), asegurando en todos los casos que la concentración final de este disolvente en los medios de cultivo fuese inferior al 0.1%.

2.2. Citotoxicidad mediante el ensayo de la sulforodamina B

La citotoxicidad se determinó sobre las distintas líneas celulares, mediante la adición de sulforodamina B (SRB) (Skehan y col., 1990) gracias a la capacidad de este compuesto de unirse a las proteínas de células vivas. Se partió de 5,000 células/pocillo (10,000 células/pocillo en caso de la línea THP-1) sembradas en placas NUNC estériles de 96 pocillos, a las que se adicionaron diferentes concentraciones de los productos. Esta determinación se realizó a 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se fijaron con ácido tricloroacético (TCA) al 50% v/v a 4 °C. Tras una hora de incubación, las placas se lavaron 5 veces con agua desionizada, se adicionaron 100 μL de SRB (0.4% p/v) en una solución de ácido acético al 1% v/v, y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Posteriormente, se lavaron de nuevo 5 veces con ácido acético al 1% v/v y se dejaron secar unos minutos antes de añadir tampón Tris Base 10 mM, para finalmente medir la absorbancia a 492 nm con un espectrofotómetro Labsystems Multiskan EX. Los resultados se expresan según el índice de inhibición 50 (IC_{50}), que se define como la dosis que produce la muerte del 50% de las células en cultivo en un tiempo determinado.

2.3. Expresión de proteínas mediante *Western Blot*

La expresión de SIRT1 se determinó empleando las líneas celulares THP-1 y HT-29. Para estos estudios se evaluaron polifenoles puros como resveratrol y quercetina, así como un extracto de hojas de mango y otro de hojas de uva.

Para la línea HT-29 se sembraron 10^6 células por pocillo, en un volumen final de 2 mL, en placas estériles NUNC de 6 pocillos. En la línea THP-1 se siguió un protocolo similar, sembrando, en este caso, 5×10^5 monocitos por pocillo. Tras 24 horas de crecimiento, ambas líneas celulares se trataron con los correspondientes tratamientos (resveratrol y quercetina: 50 μ M; extractos de hoja de mango y uva: 100 μ g/mL) o el vehículo, durante 24 horas. A continuación, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con tampón fosfato sódico (PBS) frío. En el caso de HT-29, se añadió a continuación 1 mL de PBS a cada pocillo y las células se separaron de la superficie a la que estaban adheridas mediante un raspador. Este último paso no fue necesario para las células THP-1. En ambas líneas, las células fueron recolectadas mediante centrifugación (375 g, 3 minutos, 4 °C) y resuspendidas en 50 μ L de un tampón de lisis frío compuesto por: Tris HCl (50 mM pH 7.5), $MgCl_2$ (8 mM), ácido etilen glicol-bis (β -aminoetiléter) tetracético (EGTA,)5 mM, ácido etilendiaminotetracético (EDTA, 0.5 mM), leupeptina (0.01 mg/mL), pepstatina (0.01 mg/mL), aprotinina (0.01 mg/mL), fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF, 1 mM) y NaCl (250 mM). Seguidamente, las muestras se sonicaron en un baño a 4 °C durante 15 minutos y se centrifugaron de nuevo (375 g, 5 minutos, 4 °C) para eliminar los restos membranosos. La concentración de proteínas en el sobrenadante se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando γ -globulina como estándar. El volumen de homogeneizado correspondiente a 50 μ g de proteínas se mezcló con el volumen necesario del reactivo de Laemmli (glicerol 10%, SDS (*dodecyl sulfate polyacrylamide*) 10%, azul de bromofenol 0.02% y β -mercaptoetanol 2%, en tampón Tris 1 M pH 6.8). Se desnaturalizaron las proteínas mediante incubación durante 10 minutos en un termobloque a 100 °C.

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS/PAGE), empleando geles discontinuos de acrilamida formados por un gel de empaquetamiento (5%) y otro gel de separación (10%). El gel de separación contenía acrilamida al 10%, persulfato de amonio (PSA, 0.1%), SDS (0.1%) y N,N,N',N' tetrametil etilendiamina (TEMED, 0.066%) en Tris-HCl (1 M pH 8.8). El gel de empaquetamiento contenía acrilamida al 5%, PSA al 0.1%, SDS al 0.1% y TEMED al 0.1% en Tris-HCl 1 M pH 6.8. Las muestras desnaturalizadas se sometieron a electroforesis en una cubeta Mini Protean® Tetra Cell (Bio Rad, USA) a 60 voltios y temperatura ambiente, con un tampón de electroforesis compuesto por Trizma base 0.3%, glicina 1.88% y SDS 20%. Se emplearon como marcadores de masa molecular proteínas pre-teñidas de masa molecular conocida (Bio-Rad, USA).

A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (1.5 horas, 4 °C, 100 voltios, 0.35 amperios) en un aparato Mini Trans-Blot® Cell (Bio

Rad, USA) con el tampón correspondiente (Trizma base 0.3%, glicina 1.88%, SDS 20% y etanol 96° al 25%). La efectividad de la transferencia se monitorizó mediante la tinción de la membrana con Rojo Ponceau. Posteriormente, se incubó la membrana durante 2 horas con leche en polvo al 5% en solución de octilfenilpolietilenglicol (*Nonidet*® NP-40, 0.5%) en PBS (pH 7.4) para bloquear las uniones no específicas. Seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario policlonal SIRT1 (Cell Signaling, USA) a la dilución 1:1000, en leche en polvo al 5%, durante toda la noche a 4 °C.

Tras sucesivos lavados en NP-40 y PBS pH 7.4, se procedió a la incubación, durante 1.5 horas, con el anticuerpo secundario diluido en leche en polvo al 5%. El anticuerpo secundario usado fue Goat Anti-rabbit Ig G (H + L) HRP conjugated (Pierce, USA) a la dilución 1:1000.

Para comprobar la misma carga de proteína en todos los pocillos, se analizó la expresión de β -actina, una proteína constitutiva usando un anticuerpo anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, USA) que se detectó con el anticuerpo secundario: Polyclonal Goat Anti-mouse Ig G/HRP (DakoCytomation, USA).

Finalmente, el revelado de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó mediante un kit de revelado de quimioluminiscencia (SuperSignal-West Pico Chemiluminescent Substrate) suministrado por Pierce (USA).

2.4. Producción del factor de necrosis tumoral α mediante ELISA

El estudio de producción de citocinas reguladoras de respuestas inflamatorias y tumorales se realizó empleando la línea celular THP-1, diferenciada a macrófagos desde la forma monocítica. Para ello, se sembraron 10^4 células por pocillo en placas estériles NUNC de 96 pocillos, que se trataron con PMA (0.2 μ M), durante 72 horas a 37 °C, para inducir su diferenciación a macrófagos. A continuación, las células se lavaron con PBS estéril frío para eliminar los monocitos no transformados y se añadieron 100 μ L de medio completo (37 °C) junto con los compuestos a las distintas concentraciones (resveratrol y quercetina: 12.5, 25 y 50 μ M; extractos de hoja de mango y uva: 12.5, 25 y 50 μ g/mL). Tras 1 hora de incubación con los compuestos, los macrófagos se estimularon con lipopolisacárido bacteriano (LPS) (1 μ g/mL) durante 24 horas. Los sobrenadantes de los cultivos celulares, que contenían las citocinas solubles, se recolectaron y almacenaron a -40 °C hasta su uso. La cuantificación de TNF- α se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del correspondiente kit comercial (Diacclone, Francia).

3. ESTUDIOS *IN VIVO*

3.1. Modelo murino de inflamación crónica que deriva a cáncer de colon

Para la realización de este estudio se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6 de 4 semanas de edad que presentaban la delección del gen de IL-10, es decir, ratones KO IL-10 $\text{^{-/-}}$. Estos animales, debido a esta modificación genética, desarrollan de forma espontánea inflamación colónica que, si no se controla, puede dar lugar al desarrollo de procesos cancerosos en el colon. Asimismo, se utilizaron ratones silvestres

C57BL/6 para el grupo control. Los ratones fueron suministrados por los laboratorios Charles River (Barcelona), donde fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos hasta las 4 semanas de edad. Una vez realojados los animales en las condiciones normales de estabulación, comenzó el control exhaustivo de los mismos. Con el fin de evaluar la progresión del daño en el colon a lo largo de tiempo, los ratones se examinaron a distintos tiempos, entre las 6 y las 18 semanas de edad. El número de animales utilizado por cada grupo ha estado comprendido entre 8 en el caso de los animales sanos y 14 en los animales KO. Los animales se sacrificaron mediante una sobredosis de hidrato de cloral por vía intraperitoneal.

3.1.1. Evaluación macroscópica e histopatológica

Una vez sacrificados los animales, se extrajo el colon en su totalidad, desde el ciego hasta el ano, y se limpió el interior del mismo con solución salina fisiológica para eliminar los residuos fecales. Seguidamente, se procedió a valorar el peso y la longitud del colon como indicadores de la gravedad y la extensión de la respuesta inflamatoria en la colitis. A continuación, el colon fue abierto longitudinalmente, tomándose muestras para su estudio histológico y el resto del tejido fue congelado en nitrógeno líquido para los posteriores análisis bioquímicos.

Para el análisis histológico del colon se seleccionaron al azar 3 animales por grupo. Secciones de aproximadamente 3 x 3 mm se fijaron en formaldehído al 4% durante 24 horas a 4 °C, para proceder a su deshidratación posterior en concentraciones crecientes de etanol. Tras la etapa de deshidratación, las muestras se incluyeron en parafina. Para ello, se introdujeron sucesivamente en xileno y en distintos baños de parafina a 60 °C para finalmente formar los bloques en los moldes apropiados.

Se realizaron cortes de 5 µm de grosor con un microtomo Leica Ultracut (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania), se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se dejaron secar a 37 °C durante toda la noche. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina de acuerdo con los procedimientos estándar para la evaluación histológica de daño en el colon.

La gravedad de la colitis fue analizada por un patólogo experimentado, empleando una escala de 0 a 3, donde 0 corresponde a un tejido normal, sin daño; 1 corresponde a un tejido con infiltración focal con células inflamatorias incluyendo leucocitos polimorfonucleares; 2 indica la pérdida de las glándulas, con infiltración de células inflamatorias y formación de abscesos en las criptas; y 3 se refiere a ulceración de la mucosa (Okayasu y col., 2002).

Las neoplasias asociadas a la colitis se analizaron microscópicamente y se diagnosticaron como displasia de bajo o alto grado, de acuerdo con los criterios establecidos por Riddell y sus colaboradores (Riddell y col., 1983). La incidencia de la lesión neoplásica se calculó mediante el cociente de ratones portadores de lesiones dividido por el número total de ratones.

Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio (Olympus BH-2), utilizándose los objetivos de 4x, 10x, 20x y 40x. El análisis de las imágenes fue realizado utilizando una cámara digital Kodak (DC 290 Zoom) acoplada a un sistema de análisis de imágenes automático (Motic®Images 2000 release 1.1, MicroOptic Industrial Group CO., LTD; B1 Series System Microscopes), y posterior procesamiento a través del programa informático Adobe Photoshop® 5.0 (Adobe Systems Incorporated).

3.1.2. Evaluación inmunohistoquímica

La valoración de la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y el regulador de autofagia Beclin 1 se realizó mediante el método de estreptavidina-biotina-peroxidasa empleando un kit comercial (Kit Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Secciones de 5 µm de espesor se incubaron a 37 °C durante una noche y a continuación se sometieron a un proceso de recuperación antigénica en una olla a presión en tampón citrato pH 6.0 durante 1 minuto, seguido de un enfriamiento en el mismo tampón durante 20 minutos. Posteriormente, se inhibió la actividad peroxidasa endógena mediante un baño con peróxido de hidrógeno y a continuación, las secciones se incubaron con suero normal de caballo durante 20 minutos para reducir la tinción inespecífica.

Las muestras fueron incubadas con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA (Dako Cytomation, Dinamarca) y policlonal de conejo anti-Beclin 1 (Santa Cruz Biotechnology, CA) a una dilución 1:100 durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente y después con el complejo estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente (Kit Vectastain, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Finalmente, la actividad enzimática se reveló con 3,3'-diaminobencidina (DAB) y las secciones se contratiñeron con hematoxilina para su observación al microscopio óptico.

Se utilizaron secciones como control negativo, que fueron tratadas de la misma manera pero omitiendo el anticuerpo primario específico.

El índice de proliferación celular se determinó mediante la cuantificación del número de células PCNA positivas entre al menos 200 células de la lesión, expresado como porcentaje.

3.1.3. Estudio de la expresión de proteínas mediante *Western Blot*

Los niveles de expresión de las proteínas LC3II y pAMPK se valoraron en las muestras de tejido colónico en los distintos tiempos de estudio.

Las muestras fueron procesadas por homogenización en frío con tampón de lisis (descrito en la sección 2.3). Los homogeneizados fueron centrifugados (12,000 g, 15 minutos, 4 °C) y posteriormente, se recogió el sobrenadante, que se conservó a -80°C. La concentración de proteínas del homogeneizado fue determinada aplicando el método

colorimétrico de Bradford (RW.ERROR - Unable to find reference:263). La separación de las proteínas se llevó a cabo empleando geles de SDS-poliacril-amida al 10-12%, según el procedimiento descrito en el apartado 2.3. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios específicos: LC3B (D11) XP[®] Rabbit mAb (Cell Signaling, USA) y Phospho-AMPK α (Thr172) (40H9) Rabbit mAb (Cell Signaling, USA), a dilución 1:1000, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, tras sucesivos lavados, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario 1000 Goat Anti-rabbit Ig G (H + L) HRP conjugated (Pierce, USA) en dilución 1: y, finalmente, al revelado de los complejos antígeno-anticuerpo mediante un kit de quimioluminiscencia (SuperSignal[®] West Fempto Chemiluminescent Substrate) suministrado por Pierce (USA).

3.1.4. Extracción de ARN

Una vez extraído el colon, éste se sumergió en una solución de *RNA later* (Quiagen, Holanda) para reducir al máximo la degradación del ARN. El tejido fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C hasta su uso. La extracción del ARN se realizó en un ambiente libre de ARNasas y con todo el material estéril. Las muestras de colon fueron homogenizadas en un mortero permaneciendo congeladas en nitrógeno líquido durante todo el proceso. A continuación, se procedió a realizar la extracción del ARN, a partir del tejido pulverizado, siguiendo las indicaciones de un kit comercial (SV Total RNA Isolation System, Promega). Se añadieron 175 μ L de tampón de lisis por cada 30 mg de tejido, así como 350 μ L de un tampón de dilución y la mezcla se incubó a 70 °C durante 3 minutos. Tras un proceso de centrifugación (12,000 g, 10 minutos, 4 °C) se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga que se pasó a través de las cestillas propias del kit mediante centrifugación (12,000 g, 1 minuto, 4 °C). La muestra fue tratada con DNAsas con el fin de eliminar la posible contaminación con ADN. Finalmente, el ARN extraído fue resuspendido en agua libre de nucleasas.

La cuantificación de las muestras (μ g ARN/mL) así como el grado de pureza se llevó a cabo espectrofotométricamente a 260/280 nm en el equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000.

3.1.5 Reacción de la transcriptasa inversa

La reacción de la transcriptasa inversa es una técnica enzimática que permite la obtención de ADN complementario (ADNc) a partir del templado de ARN extraído (anteriormente descrito en el apartado 3.1.4) mediante la acción de la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. El ADNc obtenido es usado como molde para generar múltiples replicaciones mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tras la adición de *primers* o cebadores diseñados para delimitar la región de interés.

La transcripción inversa del ARN extraído se llevó a cabo con el kit SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, USA). Concretamente, se retrotranscribieron 5 µg de ARN de cada una de las muestras. En primer lugar, se procedió a mezclar el volumen necesario para tomar los 5 µg de ARN con 1 µL de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 3 µL de *random hexamers*. Esta mezcla fue completada con agua DEPC hasta un volumen final de 20 µL y fue incubada en un termociclador a 65 °C durante 5 minutos para la desnaturalización del ARN. Tras esa incubación, el ARN se mantuvo en hielo durante 2 minutos. A continuación, se incubó a 42 °C durante 50 minutos con una mezcla compuesta por la enzima SuperScript II, un buffer de reacción, MgCl₂ 25mM, DTT 0.1M y RNaseOUT (40U/µl). Las proporciones de los componentes de dicha mezcla se detallan en la **Tabla 9**. La reacción se detuvo con un choque térmico a 70 °C durante 15 minutos.

Tabla 9. Reactivos y volúmenes para reacción retrotranscripción inversa.

| Componente | Volumen para 1 reacción |
|------------------------|-------------------------|
| RT Buffer 10x | 2 µL |
| MgCl ₂ 25mM | 4 µL |
| DTT 0,1M | 2 µL |
| RNaseOUT (40U/µL) | 1 µL |
| SuperScript II RT | 1 µL |

Una vez completada la retrotranscripción, el ADNc obtenido se mantuvo a -40 °C hasta su utilización.

3.1.6 Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de biología molecular, desarrollada en 1986 por Kary Mullis, que permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN. El uso de cebadores (pequeños fragmentos de ADN capaces de unirse a secuencias complementarias específicas) limita la región que se amplifica. La reacción de PCR se basa en un ciclo repetido de 3 pasos: 1) desnaturalización del ADN de doble cadena (94-95 °C), 2) hibridación del cebador en el extremo específico 3' del ADN molde, 3) elongación o extensión por acción de la ADN polimerasa en dirección 3' → 5' (a 72 °C).

La PCR cuantitativa o a tiempo real permite cuantificar la cantidad de ADN presente en la muestra original además de detectar en tiempo real los productos de amplificación a medida que transcurren los ciclos de PCR. Para ello, se requiere el empleo de fluorocromos no específicos o sondas específicas. En nuestro caso empleamos el fluorocromo SYBR Green, que se intercala en el ADN aumentando por tanto, la emisión de fluorescencia a medida que van pasando los ciclos. La detección de la fluorescencia, por parte del termociclador específico para este tipo de PCR, se realiza en la fase de extensión de la PCR a tiempo real. Este método permite cuantificar sólo

una secuencia por reacción, pero tiene la ventaja de utilizar cebadores normales para su realización y es mucho más económico que el uso de sondas específicas.

La qPCR se llevó a cabo mediante el kit SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japón) y 0,2 μ M de cada conjunto de cebadores. El ADNc fue amplificado mediante 40 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 90°C durante 3-5 segundos, una hibridación a 55-60 °C durante 10-20 segundos, y una extensión a 72 °C durante 6-15 segundos. Además, como paso previo al inicio de los ciclos, se realizó una incubación a 95°C con el fin de activar la polimerasa presente en el tubo de reacción. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Secuencias de oligonucleótidos utilizados como cebadores en los análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

| Gen diana | Secuencia Sentido 5'-3' | Secuencia Antisentido 5'-3' |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|
| GAPDH | AACGACCCCTTCATTGAC | TCCACGACATACTCAGCAC |
| Sirt1 | TGCCTCCTGAAGGCTGGGATTACAT | GGTGGTGCAAACACTGCTCCTC |
| TNF- α | GATCTCAAAGACAACCAACTAGTG | CTCCAGCTGGAAGACTCCTCCCAG |

La qPCR se llevó a cabo en el LightCycler[®] 480 Real-Time PCR System (Roche, Suiza), y los ciclos umbral (Ct) se determinaron utilizando el software de análisis LightCycler[®] 480. Para normalizar los valores obtenidos, se utilizó deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfato (GADPH) como control interno en cada muestra. El análisis de los resultados se realizó empleando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak T. D. Schmittgen, 2001), donde:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen control.}$$

$$\Delta\Delta C = \Delta Ct \text{ situación control (ratones sanos)} - \Delta Ct \text{ situación problema (ratones KO).}$$

3.2. Modelo murino de colitis ulcerosa aguda inducida por dextrano sulfato sódico

En este estudio se emplearon ratones macho de la cepa C57BL/6, de 6 semanas de edad, suministrados por los laboratorios Janvier (Francia), mantenidos en las condiciones de estabulación reglamentarias. Se ha reproducido un modelo de inflamación en el colon, basándose en los estudios previos que demuestran que la administración de DSS al 3% en el agua de bebida a los animales durante 7 días consecutivos induce una colitis aguda manifestada por diarrea sanguinolenta, pérdida de peso, acortamiento del colon, edema y ulceración de la mucosa colónica acompañada de una potente infiltración neutrofílica (Perse A. Cerar, 2012).

3.2.1. Sustancias ensayadas, dosis y vía de administración

En este modelo experimental se han utilizado el resveratrol y un extracto de hojas de mango, suministrado por la empresa Polinat. Las dosis empleadas, atendiendo a la bibliografía consultada fueron:

-Resveratrol: 50 mg/kg (Cui y col., 2010).

-Extracto de hoja de mango: 50 y 100 mg/kg (Marquez y col., 2010).

Todos los tratamientos se prepararon en forma de suspensión extemporánea, en agua. La administración fue realizada vía oral (0.1 mL/100 g de animal), una vez al día y siempre a primera hora de la mañana.

3.2.2. Inducción de la colitis ulcerosa aguda

La inflamación colónica se realizó siguiendo la técnica propuesta por Perse y col. (2012). La colitis fue inducida en todos los ratones salvo en el grupo control sano. Los diferentes tratamientos fueron administrados diariamente por vía oral, mediante sonda intragástrica, y de manera simultánea a la toma de DSS al 3% p/v (TbD Consultancy, USA), a grupos de 10 animales cada uno. Los grupos que no recibieron tratamiento fueron sondados con el vehículo (agua) durante todo el experimento.

Los animales fueron pesados y examinados diariamente a fin de encontrar signos clínicos de inflamación en el colon. Al octavo día los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se extrajo el colon de cada animal para el análisis macroscópico, histológico y bioquímico.

3.2.3. Evaluación macroscópica e histopatológica

La extracción de las muestras de colon así como su análisis macroscópico e histopatológico se realizó de manera análoga a la descrita en el anterior modelo animal (sección 3.1.1). Se analizó la longitud y peso del colon, así como la inflamación microscópica del tejido mediante la tinción con hematoxilina y eosina.

Por otro lado, se llevó a cabo el análisis histológico del moco colónico mediante la tinción con azul alcian. El azul alcian con unas condiciones de pH en torno a 2,4-2,6 tiñe de azul hidratos de carbono débilmente ácidos como el ácido hialurónico, carbohidratos con ácido siálico y mucosustancias débilmente sulfatadas. En primer lugar, los cortes histológicos fueron desparafinados e hidratados con una serie de alcoholes de concentración decreciente. Posteriormente, se procedió a su tinción con azul alcian pH 2.5 durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, las muestras se lavaron con agua destilada durante 5 minutos y se sometieron a un proceso de deshidratación con alcoholes de concentración creciente, acabando con xileno. El área de las glándulas teñidas con azul alcian fue analizada mediante un sistema informático de captación de imágenes (Motic®Images 2000 release 1.1) acoplado a un microscopio óptico Olympus BH-2.

3.2.4. Actividad de la enzima mieloperoxidasa

Los neutrófilos están implicados en una serie de desórdenes gastrointestinales entre los que se incluye la colitis ulcerosa. Estos leucocitos migran a la zona inflamada y se transforman en células secretoras de radicales libres de oxígeno y enzimas

lisosomales, entre otros compuestos, originando la reacción tisular que provocará la producción del daño en el tejido (Bjarnason y col., 1993).

La determinación de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO), proteína constitutiva de los neutrófilos, es un método válido para cuantificar el grado de infiltración leucocitaria inflamatoria. Esta enzima es liberada a los fluidos extracelulares, donde oxida a haluros y tiocianatos y se forman los correspondientes ácidos hipohalurosos. Estos ácidos reaccionan con los sustratos disponibles, disminuyendo así su reactividad y además, participan en la génesis de potentes oxidantes como las cloraminas.

Para la medida de esta actividad enzimática se siguió el método propuesto por (Bradley y col., 1982), basado en la oxidación, dependiente de H_2O_2 , usado como donador de hidrógeno, de un donador artificial de electrones, orto-dianisidina, con producción de un cromógeno anaranjado cuya absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm (**Figura 7**).

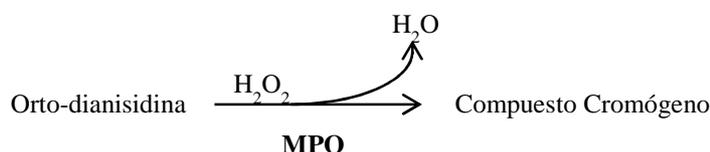


Figura 7. Reacción enzimática de la MPO sobre la orto-dianisidina en presencia de H_2O_2 .

Para la realización de esta técnica, las muestras fueron homogeneizadas en tampón fosfato potásico pH 7.4 y centrifugadas (20,000 g, 20 minutos, 4 °C). El precipitado se volvió a homogeneizar en 10 volúmenes de tampón fosfato potásico pH 6.0, que contenía 0.5% de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HETAB) y 10 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). La adición de HETAB ayudó a solubilizar completamente la MPO presente en las membranas. Seguidamente, el homogeneizado se sometió a un ciclo de congelación-descongelación, y a una sonicación durante 15 segundos, lo cual favoreció la liberación total de la enzima.

Para la determinación espectrofotométrica, se pipetearon en una microplaca 50 μ L de los distintos homogeneizados diluidos en 10 volúmenes de tampón fosfato potásico 50 mM pH 6.0. Posteriormente, se añadieron consecutivamente 50 μ L de los diferentes reactivos, o-dianisidina (0.067%), HETAB (0.5%) y H_2O_2 (0.003%), y tras un tiempo de incubación de 5 minutos se midió la absorbancia en un lector de placa Labsystems Multiskan Ex. (Helsinki, Finlandia) a 450 nm.

Los resultados se expresaron como Unidades de actividad enzimática por miligramo de tejido (U/mg tejido).

3.2.5. Producción de citocinas mediante ELISA

Los niveles de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 fueron determinados por una técnica de inmunoanálisis enzimático cuantitativo (ELISA).

Las muestras de colon fueron homogeneizadas en PBS a pH 7.2 conteniendo EDTA 0.5 mM, aprotinina 0.01 mg/mL, pepstatina 0.01 mg/ml, leupeptina 0.01 mg/ml, y PMSF 1 mM a 4 °C durante 20 segundos. A continuación, se centrifugaron a 13,400 g durante 10 minutos, y los sobrenadantes se conservaron a -80 °C hasta su uso.

Las cuantificaciones de los niveles de citocinas se realizaron siguiendo las instrucciones del kit comercial para cada una de ellas (PeproTech, USA). Los diferentes patrones y las muestras se pipetearon en pocillos recubiertos de un anticuerpo monoclonal específico para cada citocina en estudio. Tras el lavado, se adicionó un anticuerpo policlonal específico para la citocina unido a una peroxidasa y los sustratos, peróxido de hidrógeno y TMB. La reacción enzimática produjo un color azul que cambió a amarillo tras la adición de ácido sulfúrico 1M. La intensidad de color se midió a 450 nm en lector de placa Labsystems Multiskan Ex.

3.2.6. Expresión de proteínas mediante *Western Blot*

La expresión proteica de las proteínas COX-2, SIRT1 y pAMPK se determinó en las muestras de colon de forma similar al protocolo descrito en el apartado 3.1.3.

3.3. Modelo basado en el nematodo *Caenorhabditis elegans* para estudios de respuestas vitales y de expresión génica

3.3.1. Cepas empleadas

Para el desarrollo de los experimentos se emplearon las siguientes cepas de *C. elegans*:

- N2, empleada como organismo control.
- *ire-1*, mutante para el gen *ire-1* (*inositol-requiring enzyme 1*).
- *sir2.1*, que presenta delección en el gen de sirtuína 2.1.
- *aak2*, mutante para el gen *aak2* (*AMP-activated protein kinase*) (homólogo de AMPK).

3.3.2. Sustancias ensayadas

Los distintos compuestos que se emplearon en el tratamiento de los gusanos fueron añadidos a las diferentes concentraciones ensayadas tanto al agar como a la solución de bacterias que sirve de alimento a los gusanos.

Se empleó metformina (Sigma, USA), resveratrol (Sigma, USA) y un extracto de hojas de mango (Polinat, España). Se partió de una solución stock desde la cual se

preparaba el agar y la solución de bacterias a la concentración deseada. En el caso del resveratrol y el extracto de mango se utilizó DMSO para garantizar la solubilidad de los mismos. En todos los casos las placas contenían un volumen final inferior al 0,1% de DMSO en el medio de cultivo, incluyendo las placas control sin tratamiento, en las cuales se incorporó únicamente el disolvente para mantener en el agar la misma composición que en los ensayos con los diferentes tratamientos.

3.3.3. Preparación de placas de agar

El desarrollo y crecimiento del gusano se llevó a cabo en placas de Petri con medio NGM (del inglés *Nematode Growth Medium*). Las placas se realizaron mezclando 3 g de NaCl, 17 g de agar y 2.5 g de peptona en 975 mL de agua destilada. Esta mezcla se autoclavó durante 50 minutos y a continuación, se enfrió en un baño de agua a 55 °C durante 15-20 minutos. Una vez atemperado el medio, se completó con 1 mL de CaCl₂ (1M), 1 mL de colesterol (5 mg/mL etanol), 1 mL de MgSO₄ (1M) y 25 mL de buffer KPO₄ (1M, pH 6.0, 108.3 g KH₂PO₄, 35.6 g K₂HPO₄ en 1L de agua), todo ello previamente esterilizado en autoclave.

El medio NGM se transfirió a las placas de Petri en campana de flujo laminar bajo condiciones estériles. La cantidad de medio en todas las placas era constante para homogenizar todas las condiciones y para facilitar el visionado de los gusanos reduciendo así la necesidad de refocalizar el microscopio al cambiar de una placa a otra. Las placas se dejaron enfriar a temperatura ambiente en la campana de flujo, para finalmente ser almacenadas en una cámara fría a 4°C.

3.3.4. Preparación del medio de crecimiento para bacteria *Escherichia coli* y sembrado de placas

Las bacterias *E. coli* de la cepa OP50 se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB), que contenía: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1L de agua destilada. El pH fue ajustado a pH 7.0 con NaOH 1M, y el medio de cultivo esterilizado en autoclave.

Las placas con medio NGM se sembraron con las bacterias crecidas en el medio de cultivo. Se añadieron 50-100 µL del cultivo de *E. coli*, según el diámetro de la placa. Las bacterias fueron extendidas por toda la superficie de la placa, sin dañar el agar y sin llegar a los bordes para minimizar la salida de los gusanos de las placas.

3.3.5. Transferencia de gusanos entre placas

Para transferir gusanos individualmente de una placa a otra se utilizó un asa de siembra de alambre de platino de calibre 32 bajo el microscopio con una llama próxima para garantizar la esterilidad en las placas. El alambre termina en un extremo aplanado

para facilitar el traspaso. Cada vez que se procedía al paso de un gusano se flameaba el alambre para esterilizarlo.

La siembra de una nueva placa con gusanos se hacía transfiriendo un trozo de agar con gusanos desde una placa vieja a una placa fresca con ayuda de un bisturí esterilizado.

C. elegans es transparente por lo que puede ser visualizado usando un microscopio equipado con una fuente de luz blanca. El gusano que se quiere traspasar se observa primero al microscopio, y a continuación con el alambre flameado y enfriado se recoge el gusano depositándolo suavemente en la nueva placa.

3.3.6. Sincronización de la población de gusanos

Para que todos los individuos que se van a utilizar en un ensayo se encuentren en el mismo estado larvario es necesario hacer una sincronización de la población. Para ello, se dejaron crecer gusanos en las placas durante varios días hasta obtener una placa con gran cantidad de huevos y gusanos hermafroditas con huevos en su interior.

El siguiente paso fue la recogida de los gusanos y huevos presentes en la placa en tubos falcon de 15 mL con tampón M9 (3 g de KH_2PO_4 , 6 g de Na_2HPO_4 , 5 g de NaCl , 1 mL de MgSO_4 1M y agua destilada hasta 1 L, todo ello esterilizado por autoclavado). A continuación, los tubos se centrifugaron (1000 g, 1 minuto, 4 °C) descartando el sobrenadante. Sobre el residuo se añadieron 6 mL de una solución de hipoclorito sódico al 12%, la cual destruye todas las larvas y carcasas de los gusanos adultos sin afectar a los huevos, y se agitó vigorosamente durante 6 minutos. Trascurrido ese tiempo, se realizó una nueva centrifugación (1000 g, 1 minuto, 4 °C) para retirar el sobrenadante. Para eliminar los posibles restos de la solución de hipoclorito, se procedió a lavar con 10 mL de tampón M9, repitiendo este proceso 3 veces. El residuo final del último lavado se resuspendió en 2 mL de tampón M9 y se dejó a 20°C en agitación durante 18-24 horas. En ese tiempo eclosionarán los huevos y las larvas permanecerán en estado L1.

El sincronizado obtenido fue valorado en cuanto a la viabilidad y la cantidad de larvas presentes tomando una alícuota de 5 μL y observándola al microscopio para comprobar si las larvas L1 estaban vivas y cuántas había. De esta forma, se sembraba el número de gusanos que necesitara cada experimento.

3.3.7. Cuantificación de triglicéridos

La obesidad en *C. elegans* debe entenderse como un mayor acúmulo de triglicéridos; en este sentido, los lípidos son almacenados como triglicéridos en forma de gotitas en las células intestinales e hipodérmicas (Ashrafi, 2007). El nivel de

triglicéridos en el nematodo se cuantificó mediante una tinción con aceite rojo (*Oil Red O*) aprovechando su cuerpo semitransparente.

Para la realización de esta técnica, los gusanos de las cepas N2, *ire1* y *sir2.1* se colocaron en presencia de los compuestos de interés (metformina a 100 mM o resveratrol a 100 μ M) para después cuantificar la cantidad de triglicéridos comparándolos con un grupo control sin tratamiento. Los gusanos estaban en contacto con el compuesto desde la eclosión de los huevos hasta la recogida de los mismos en estado L4.

Se recogieron entre 200 y 300 gusanos de cada placa de estudio en estado L4-preadulto con tampón fosfato PBS y se transfirieron a un tubo eppendorf. El contenido se resuspendió en 120 μ L de PBS y 120 μ L de tampón 2xMRWB compuesto por 800 μ L de KCl 2M (160 mM final), 80 μ L de NaCl 5M (40 mM final), 2 mL de EGTA 0.1M (20 mM final), 1 mL de Spermidina 0.1M (10 mM final), 600 μ L de PIPES 0.5M, pH 7.4 (15.1 g/100mL) y 5 mL de metanol 100% (50% final) en un volumen final de 10 mL completado con agua destilada, con un contenido final de paraformaldehído al 2%. Los gusanos permanecieron en esa solución durante al menos una hora en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, el buffer fue eliminado y se lavaron con PBS para eliminar posibles restos de paraformaldehído. Posteriormente, se añadió 1 mL de isopropanol al 60 % y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Finalmente, se retiró el isopropanol y se añadió 1 mL de *Oil Red O* al 60 %, incubándose durante toda la noche en agitación. Para visualizar los gusanos al microscopio se retiró el tinte y se añadieron al tubo eppendorf 200 μ L de PBS conteniendo tritón X-100 al 0.01%. Se tomaron 10 μ L de la solución con los gusanos y se depositaron en un portaobjetos de vidrio sobre una gota de agarosa al 2%.

Las imágenes fueron cuantificadas usando el software ImageJ, analizando al menos 15 gusanos por cada uno de los tratamientos ensayados y por triplicado.

3.3.8. Extracción de ARN

Para la extracción del ARN de *C. elegans* se partió aproximadamente de 1000 gusanos por grupo en estado L4-adulto. La extracción se realizó empleando 400 μ L del reactivo Trizol seguido de 3 ciclos de congelación a -80°C y descongelación a 37°C . A continuación, se adicionaron 200 μ L más de Trizol y 140 μ L de cloroformo (CHCl_3), agitando y dejando reposar al menos 2 minutos para posteriormente proceder a su centrifugación (12,000 g, 15 minutos, 4°C). La fase acuosa fue retirada y se añadió el mismo volumen de etanol al 70%. A partir de este homogeneizado se llevó a cabo la extracción del ARN total utilizando un kit comercial (RNeasy kit, Qiagen), mediante el cual y gracias a unas cestillas que atrapan específicamente el ARN se procedió a la extracción del mismo. Finalmente, el ARN fue recuperado de las cestillas con 50 μ L de agua libre de RNasas. La cantidad de ARN obtenido fue cuantificada mediante un Nanodrop.

3.3.9. Reacción de la transcriptasa inversa

La retrotranscripción del ARN extraído (según la técnica descrita en el apartado 3.3.8) se realizó mediante el kit comercial Masterscript RT-PCR System (5 Prime, Alemania). El procedimiento fue similar al explicado en el punto 3.1.5, con pequeñas modificaciones según el kit comercial utilizado en este caso.

El ADNc obtenido fue cuantificado en el Nanodrop y congelado a -80°C hasta su uso.

3.3.10. Análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Para los estudios de expresión se utilizó FastStar Universal SYBR Green (Roche, Suiza). Se tomaron 10 µL de SYBR Green, 2 µL de cada cebador a 5 µM, 1 µL de agua y 5 µL de la muestra previamente diluida. La lectura se realizó durante 40 ciclos consistiendo cada uno de ellos en una desnaturalización a 90°C durante 3-5 segundos, una hibridación a 55-60 °C durante 10-20 segundos, y una extensión a 72 °C durante 6-15 segundos en un termociclador de Applied Biosystems y los resultados se obtuvieron empleando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como cebadores en cada reacción de PCR se detallan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Secuencias de oligonucleótidos utilizados como cebadores en los análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

| Gen diana | Secuencia Sentido 5'-3' | Secuencia Antisentido 5'-3' |
|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| Act-1 | GTCGGTATGGGACAGAAGGA | GCTTCAGTGAGGAGGACTGG |
| Sir2.1 | GTGGTTTCGTCTTGCTCATCA | CTCGTTGCAAGTCCAGATGT |
| Fil1 | TCCTGTGATTTGGGTCTTCC | GCCATGGAAGAGGTGTCAAT |
| Fil2 | TGTGAATGGGACTGATGGAA | CAAACAAGCCGACTGTTTCTT |
| Aakα | AGAGTCGGAGTCAGCCAAGT | TTGAGCTCTTGTGCTGCTT |

3.3.11. Ensayos de longevidad

Los ensayos que se presentan a continuación, evaluando el efecto del extracto de hojas de mango en la longevidad, longitud del cuerpo y bombeo faríngeo, han sido llevados a cabo en una estancia predoctoral de 3 meses de duración en la Humboldt-Universität de Berlín, en el grupo del Dr. Christian E. W. Steinberg.

Dado que *C. elegans* posee una esperanza de vida que se aproxima a los 25 días, este nematodo es un organismo muy utilizado en estudios de longevidad. Para este ensayo es necesario obtener una población de gusanos sincronizada y controlar que no convivan distintas generaciones.

En el estudio de longevidad, se realizó una preparación sincronizada de gusanos tanto N2 como *sir2.1*. Se partió de 25 gusanos en estado L4 que fueron cultivados en placas con agar NGM que contenían el extracto de hoja de mango a las concentraciones

de 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, además de la solución alimentaria de *E. coli* con la misma concentración del extracto. Paralelamente, se incluyeron placas control sin tratamiento. Durante el período más fértil de los gusanos, es decir los primeros días de adulto, éstos eran transferidos diariamente a placas nuevas para evitar el desarrollo de nuevos gusanos que perjudicaran el seguimiento de los organismos iniciales. Tras finalizar su periodo reproductivo, los gusanos eran transferidos cada 1 o 2 días a placas nuevas. Diariamente se anotaba el número de gusanos fallecidos o desaparecidos. Los gusanos eran considerados muertos si no mostraban ningún movimiento, ni corporal ni de bombeo, al ser golpeados suavemente con el asa de platino. Se midió la longevidad de la cepa N2 y del mutante *sir2.1* en 3 experimentos diferentes.

3.3.12. Ensayos de longitud del cuerpo

Para la realización de los estudios del tamaño corporal, se ensayó el extracto de hoja de mango a las concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en los gusanos N2 y los mutantes *sir2.1*.

El primer día del experimento se prepararon las placas de agar NGM con las concentraciones del extracto indicadas, que se solubilizaron en una solución de DMSO a una concentración final menor del 0.1%. Paralelamente, se incluyeron placas control sin tratamiento y con la misma concentración de DMSO que en las placas que incluían el extracto. A continuación, se adicionaron a las placas 1000 μL de solución bacteriana *E. coli* OP50 conteniendo también el extracto a las concentraciones deseadas. Finalmente, las placas se dejaron secar en una campana de flujo y, una vez secas, se transfirieron a las mismas entre 25 y 30 gusanos en estado de larva L4.

Trascurridos 4 días, entre 20 y 30 gusanos en estado L4 se transfirieron a nuevas placas que contenían cada una de las concentraciones del extracto ensayadas. Este procedimiento permitió iniciar los experimentos de longitud del cuerpo con gusanos que eclosionaron en un medio con la concentración de extracto deseada. Las placas se mantuvieron a 20°C y los gusanos fueron transferidos diariamente a nuevas placas para evitar la presencia de otras generaciones y así hasta alcanzar el sexto día de adulto. Para medir la longitud de los nematodos en este estado de desarrollo, se provocó la muerte de los gusanos por radiación ultravioleta. Brevemente, las placas con los gusanos adultos fueron colocadas boca abajo sin la tapadera en un Fluo-Link (*Vilber Lourmat, Francia*) recibiendo una intensidad de $7\text{mw}/\text{cm}^2$ durante 5-10 minutos. Estas condiciones inducen la muerte de los nematodos, manteniendo el cuerpo íntegro.

Para la cuantificación del tamaño corporal los gusanos fueron estirados y medidos a través de un microscopio acoplado a una cámara y un software de procesamiento de datos. La longitud fue determinada en 40 gusanos por grupo en 3 experimentos independientes.

3.3.13. Ensayos de bombeo faríngeo

La cuantificación del bombeo faríngeo se realizó para comprobar si los gusanos ingerían el extracto y observar si reducían la ingesta de alimento, lo cual podría relacionarse con fenómenos de longevidad derivados de una reducción de la ingesta calórica.

El bombeo faríngeo se cuantificó al sexto día de adulto, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior para obtener gusanos en tales condiciones. El análisis se realizó mediante la grabación de vídeos de 1 minuto de duración y posterior conteo de las veces que se producía el bombeo. Se cuantificaron 20 gusanos por grupo de las cepas N2 y del mutante para *sir2.1* en 3 experimentos diferentes.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se presentan en el apartado de *Resultados* de este trabajo, se expresan como la media \pm error estándar de las valoraciones obtenidas en las muestras ensayadas. Los datos han sido tratados con el programa GraphPad 5.0. En poblaciones múltiples, con diferentes medias, se analizó la varianza de las mismas mediante el test ANOVA (análisis de varianza) de una rama, comparándose dichas medias mediante un test de Bonferroni. También se realizó el test t-Student el análisis de dos poblaciones entre sí. Un valor de p igual o <0.05 se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS *IN VITRO*

1.1. Citotoxicidad de polifenoles y extractos

La citotoxicidad del resveratrol y la quercetina, así como de dos extractos, un extracto de hojas de mango y otro extracto de hojas de uva se ensayó sobre la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29 y sobre la línea de leucemia monocitaria aguda THP-1 con el método de la SRB. Con esta técnica se busca determinar la concentración de cada compuesto que causa la muerte del 50% de la población en cultivo (IC_{50}). Estos ensayos se realizaron con el objeto de evaluar la posible actividad contra células cancerosas, así como para seleccionar concentraciones no letales de los productos en los estudios de expresión de proteínas y producción de citocinas.

Se ensayaron concentraciones desde 6.25 μ M hasta 100 μ M para los compuestos puros (resveratrol y quercetina) y desde 6.25 μ g/mL hasta 100 μ g/mL para los extractos de mango y uva. Los resultados obtenidos tras diferentes experimentos realizados a 24, 48 y 72 horas mostraron concentraciones de IC_{50} mayores de 100 μ M ó 100 μ g/mL para todos los compuestos, por lo que se concluyó que las muestras en estudio no presentaban citotoxicidad sobre ninguna de las dos líneas celulares estudiadas. Dado que se trata de compuestos naturales presentes en gran cantidad de alimentos, era de esperar que no presentaran actividad citotóxica.

1.2. Estudio de la expresión de sirtuína 1

El efecto de los diferentes polifenoles sobre la expresión de SIRT1 en las líneas celulares HT-29 y THP-1 se evaluó mediante la técnica de *Western Blot*.

Los resultados correspondientes a la línea celular HT-29 muestran que tras 24 horas de tratamiento con resveratrol a la concentración de 50 μ M, así como con los extractos de hojas de mango y uva a 100 μ g/mL se incrementó de manera significativa la expresión de SIRT1 en relación al grupo control. Sin embargo, no se detectaron cambios significativos tras el tratamiento con quercetina (**Figura 8 A**).

El análisis de los niveles de expresión de SIRT1 en los monocitos THP-1 mostró resultados similares a los obtenidos con las células HT-29, aunque, en este caso, todos los polifenoles fueron capaces de inducir un aumento significativo en la expresión de esta enzima (**Figura 8 B**).

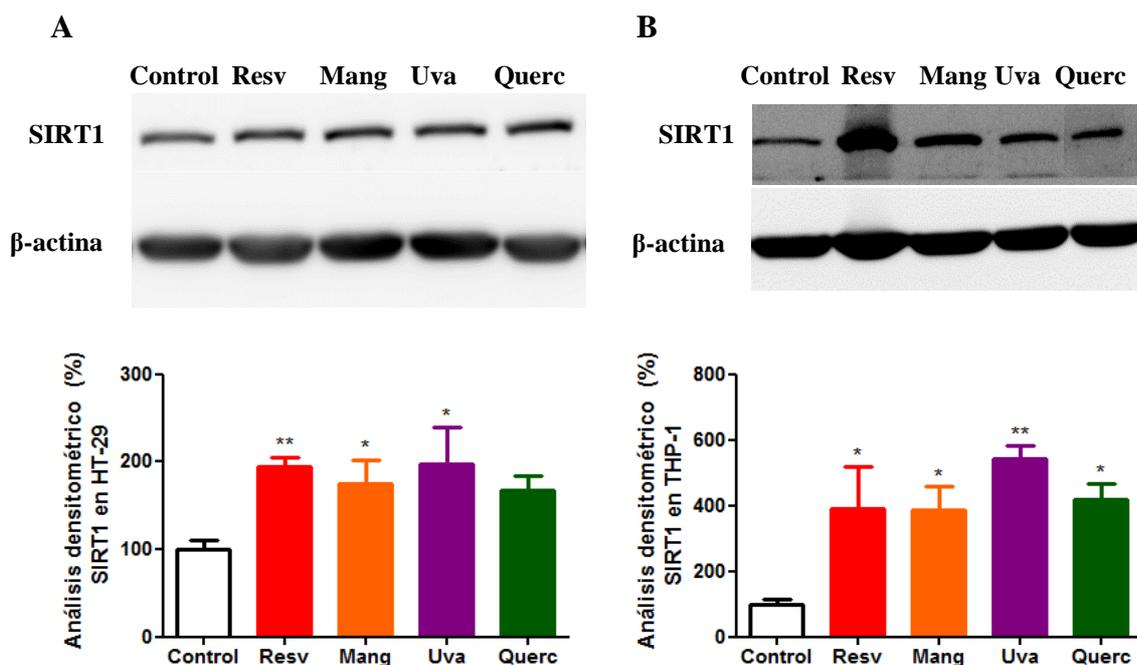


Figura X. Efecto de resveratrol (Resv), quercetina (Querc), extracto de hoja de mango (Mang) y hoja de uva (Uva) sobre los niveles de expresión de sirtuina 1 (SIRT1) en la línea celular de adenocarcinoma de colon HT-29 (A) y en monocitos THP-1 (B). Las células se trataron con resveratrol y quercetina a 50 μ M y con los extractos de hoja de mango y uva a 100 μ g/mL durante 24 horas. La expresión se midió mediante *Western Blot*. El análisis densitométrico fue valorado comparándolo con el gen control de β -actina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de un test de Bonferroni. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. control.

1.3. Estudio de la producción del factor de necrosis tumoral- α

La actividad antiinflamatoria de los diferentes polifenoles se evaluó mediante la producción de la citocina TNF- α en macrófagos THP-1.

Los resultados de la técnica de ELISA pusieron de manifiesto un incremento significativo de los niveles de TNF- α en las células estimuladas con LPS en comparación con las células no estimuladas ($p < 0.001$). Como era de esperar, la dexametasona, utilizada como fármaco antiinflamatorio, redujo significativamente la producción de esta citocina ($p < 0.001$). Los tratamientos con los diferentes polifenoles durante 24 horas a las concentraciones ensayadas (resveratrol y quercetina: 12.5, 25 y 50 μ M; extractos de hoja de mango y uva: 12.5, 25 y 50 μ g/mL) provocaron una disminución significativa en los niveles de TNF- α , y de manera concentración dependiente (**Figura 9**). Interesantemente, las concentraciones mayores de quercetina (50 μ M) y del extracto de hojas de mango (50 μ g/mL) presentaron un efecto similar al de la dexametasona (1 μ M).

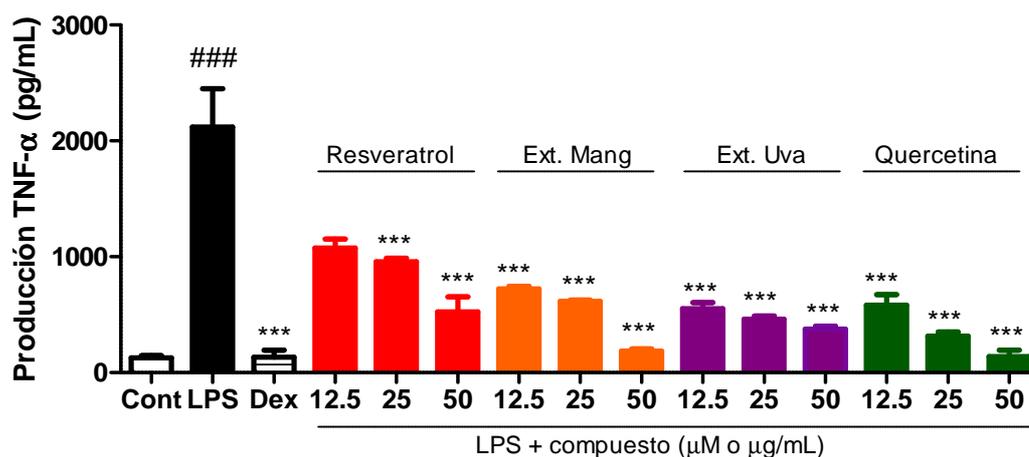


Figura 9. Efecto de resveratrol, quercetina, extracto de hoja de mango y hoja de uva en la producción de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α , pg/mL) en macrófagos THP-1. Los macrófagos se obtuvieron a partir de monocitos incubados con PMA 0.2 μ M, 72 h. La producción de TNF- α se determinó mediante ELISA en el sobrenadante de los cultivos. Las células recibieron un pre-tratamiento de 1 hora con resveratrol y quercetina (12.5, 25 y 50 μ M) y con los extractos de hoja de mango y uva (12.5, 25 y 50 μ g/mL) o con dexametasona (1 μ M), y se estimularon seguidamente con LPS (1 μ g/mL) durante 24 horas. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA seguido de un test de Bonferroni. (###) $p < 0.001$ vs. control; (***) $p < 0.001$ vs. LPS.

2. MODELO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA QUE DERIVA A CÁNCER DE COLON

El modelo de inflamación desarrollado se basó en ratones deficientes en IL-10. Estos ratones desarrollan de forma espontánea inflamación de colon que, a medida que la enfermedad avanza, puede derivar en un cáncer de colon. Las alteraciones que sufren los animales se asemejan a las que desarrollan los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, incluyendo la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa

2.1. Valoración macroscópica de la colitis

Los ratones deficientes en IL-10, en estado de estabulación estándar no estéril, empezaron a manifestar síntomas visibles de inflamación en el colon a partir de las 6 semanas de edad. Como se observa en la **Figura 10 A**, el tejido al inicio del ensayo presentaba un aspecto normal, tejido que fue engrosándose en los animales IL-10^{-/-} a medida que la edad de los mismos avanzaba. Las manifestaciones externas del proceso de colitis no fueron tan evidentes, reduciéndose a heces de menor consistencia, a veces sanguinolentas, y al enrojecimiento del ano en la casi totalidad de los animales KO desde las 6 semanas de edad (**Figura 10 B**).

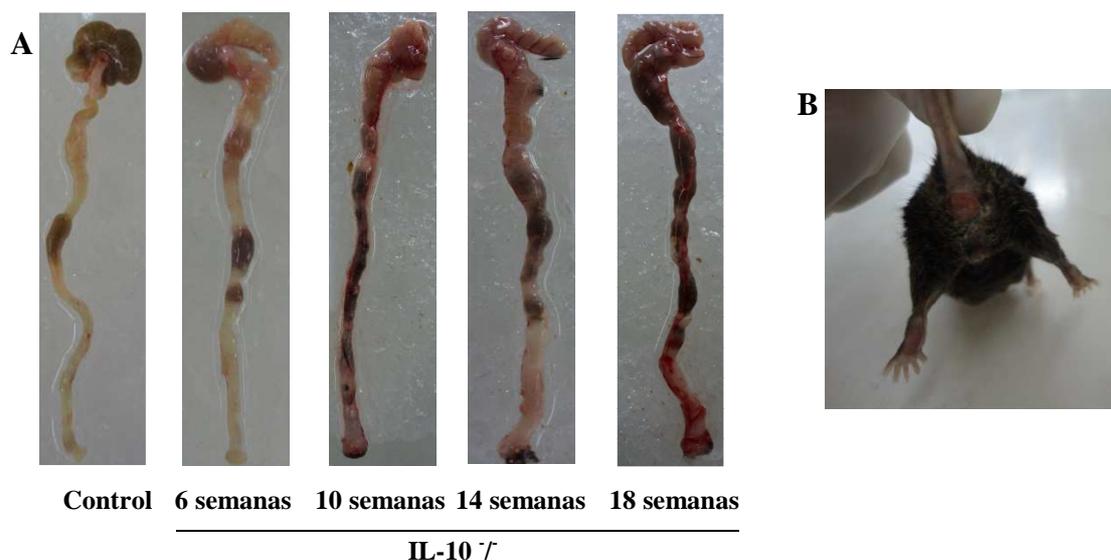


Figura 10. Aspecto macroscópico del colon extraído de los animales control y de los ratones *knockouts* para IL-10 a las 6, 10, 14 y 18 semanas de edad (A). Inflamación anal y restos de heces diarreicas en un ratón IL-10^{-/-} (B).

Los cambios inflamatorios en el colon estuvieron asociados a un incremento significativo en la relación peso/longitud del colon en todos los grupos de ratones deficientes en IL-10 en comparación con sus respectivos homólogos WT ($p < 0,001$) (**Figura 11**).

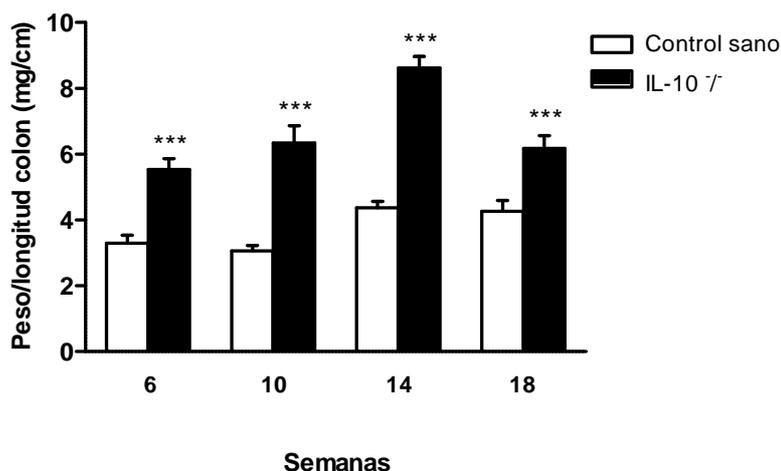


Figura 11. Relación peso/longitud del colon (mg/cm) en los animales control y los ratones *knockouts* para IL-10 a las 6, 10, 14 y 18 semanas de edad. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=8-14). Análisis estadístico mediante ANOVA seguido de un test de Bonferroni. (***) $p < 0.001$ vs. control sano respectivo.

2.2. Estudios histológico del daño colónico

En el estudio histológico de la mucosa colónica de un animal sano se puede observar que ésta se encuentra ricamente cubierta por las criptas de *Lieberkühn* y posee un epitelio constituido por una mezcla de células de absorción y células mucosas que forman invaginaciones tubulares rectas no ramificadas, y que se extienden desde la superficie hasta la muscular de la mucosa. Las células mucosas contienen numerosos gránulos de mucina, que proporcionan al citoplasma el aspecto redondeado, al que deben su nombre de células con forma de copa o caliciformes. A medida que éstas se aproximan hacia la superficie del intestino grueso comienzan a secretar moco, y siguen migrando hacia el exterior para formar parte del epitelio superficial, que se compone principalmente de células columnares.

La lámina propia del intestino grueso está constituida por colágeno, reticulina y fibroblastos inmersos en una matriz de glucosaminoglucanos. Inmediatamente por debajo de la membrana basal del epitelio superficial existe una capa de colágeno compacto, en la que se insertan las fibras musculares lisas finas de la muscular de la mucosa. El contenido celular de la lámina propia incluye linfocitos y eosinófilos diseminados. También se observan folículos linfoides pequeños, algunos de los cuales, los más grandes, atraviesan la muscular de la mucosa y se extienden en la submucosa.

La submucosa es laxa y está formada por fibrocolágeno, lo que permite el deslizamiento de la mucosa sobre la capa muscular, la cual se compone principalmente de musculatura circular, aunque existe también una musculatura longitudinal estrecha y

discontinua que forma la tenia del colon. Hay una gran acumulación de ganglios y nervios entre las dos capas musculares.

En el presente estudio, la severidad de la colitis también se evaluó mediante el análisis microscópico de la mucosa colónica, aplicando la escala propuesta por (Okayasu y col., 2002). La tinción con hematoxilina y eosina de los cortes histológicos de tejido colónico de animales sanos reveló una arquitectura normal sin modificaciones histológicas (**Figura 12 A**). Por el contrario, el estudio microscópico de los ratones deficientes en IL-10 evidenció el desarrollo de una colitis inflamatoria a partir de las 6 semanas de edad. Estos animales presentaron una inflamación leve, caracterizada por la infiltración de células inmunes en la mucosa colónica (**Figura 12 B**). Como era de esperar, la gravedad de la colitis espontánea en los ratones KO aumentó gradualmente con la edad, según muestran los resultados del estudio del grado de lesión histológica (**Tabla 12**). Como se aprecia en la **figura 12**, los ratones de edad comprendida entre 10 y 18 semanas presentaron una mayor superficie ulcerada, con destrucción total o parcial de las glándulas y con un aumento del infiltrado inflamatorio leucocitario en la mucosa y submucosa (**Figura 12 C-E**).

Tabla 12. Grado de inflamación colónica e incidencia de lesiones neoplásicas en los ratones *knockouts* (KO) para IL-10 a las 6, 10, 14 y 18 semanas de edad. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=8-14). (*) p<0.05, (**) p<0.01 y (***) p<0.001 vs. control sano; (+) p<0.05 y (+++) p<0.001 vs. ratones KO de 6 semanas; (#) p<0.05 vs. ratones KO de 10 semanas.

| Grupo | Edad (semanas) | Escala de colitis (0-3) | Displasia de bajo grado | Displasia de alto grado | |
|----------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------------|--|
| Control sano | 6-18 | 0 | 0 | 0 | |
| IL-10 $\gamma\gamma$ | 6 | 0.75 \pm 0.2 * | 0/8 (0%) | 0/8 (0%) | |
| | 10 | 1.37 \pm 0.3 ** | 5/8 (63%) | 0/8 (0%) | |
| | 14 | 1.87 \pm 0.4 *** + | 6/8 (75%) | 3/8 (38%) | |
| | 18 | 2.43 \pm 0.2 *** +++ # | 14/14 (100%) | 10/14 (71%) | |

La **Tabla 12** también recoge los resultados correspondientes a la incidencia de lesiones displásicas, expresados como el cociente entre el número de ratones que presentaban displasia en cada grupo y el número total de ratones por grupo. La

severidad de la displasia se correlacionó positivamente con la edad de los animales y el grado de inflamación colónica. Así, a las 6 semanas de edad ninguno de los ratones IL-10^{-/-} presentaba lesiones displásicas. Transcurridas las 10 semanas de edad, los animales únicamente desarrollaron displasia de bajo grado, detectada en el 63% de los mismos. En los ratones deficientes en IL-10 de 14 semanas ya comenzaron a detectarse los primeros casos displasia grave, en un 38% de los mismos. Como era de esperar, la incidencia de la displasia de alto grado fue mucho mayor en los ratones KO de 18 semanas de edad (71%), animales que presentaron además las mayores puntuaciones en el índice de colitis. Interesantemente, no se detectó la presencia de adenocarcinomas en ninguno de los ratones deficientes en IL-10 (**Tabla 12** y **Figura 12**).

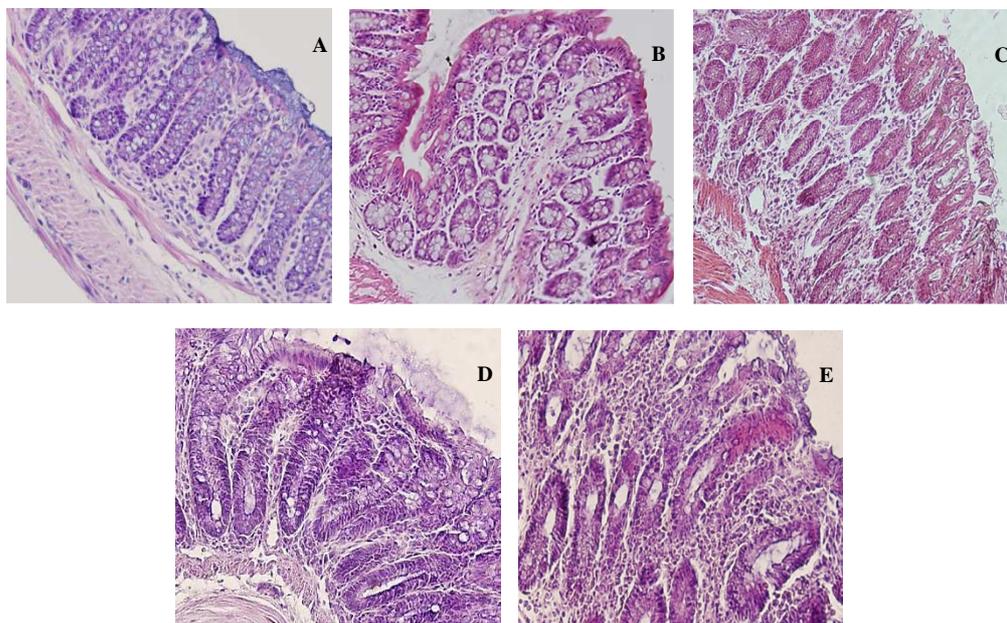


Figura 12. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes histológicos procedentes de colon de ratones sanos y ratones *knockouts* para IL-10 entre las 6 y 18 semanas de edad. Los ratones sanos no presentaron síntomas de enfermedad, con una estructura del tejido totalmente normal (A). En los ratones IL-10^{-/-} la severidad de la inflamación y displasia se correlacionó con la edad de los animales: se detectó la presencia de inflamación desde las 6 semanas de edad (B), displasia de bajo grado a las 10 semanas (C) y signos de inflamación grave con displasia de alto grado a las 14 y 18 semanas de edad (D y E, respectivamente). Las imágenes tienen una magnificación de 200x.

2.3. Estudio inmunohistoquímico del antígeno nuclear de proliferación celular

El estudio de localización de PCNA reveló una inmunotinción moderada de este marcador de proliferación celular en el colon de los animales sanos, restringiéndose a la zona proliferativa en la base de las criptas (**Figura 13 A**). La mucosa colónica de todos los ratones deficientes en IL-10 (desde las 6 hasta las 18 semanas de edad) mostró un incremento en el número de células en proliferación, que se extendieron también a la parte superior de las criptas (**Figura 13 B-E**). Como se observa en la **Figura 14**, el

Resultados

mayor índice de PCNA se detectó, como era de esperar, en los ratones KO de 18 semanas, correlacionándose con la mayor incidencia de displasia grave.

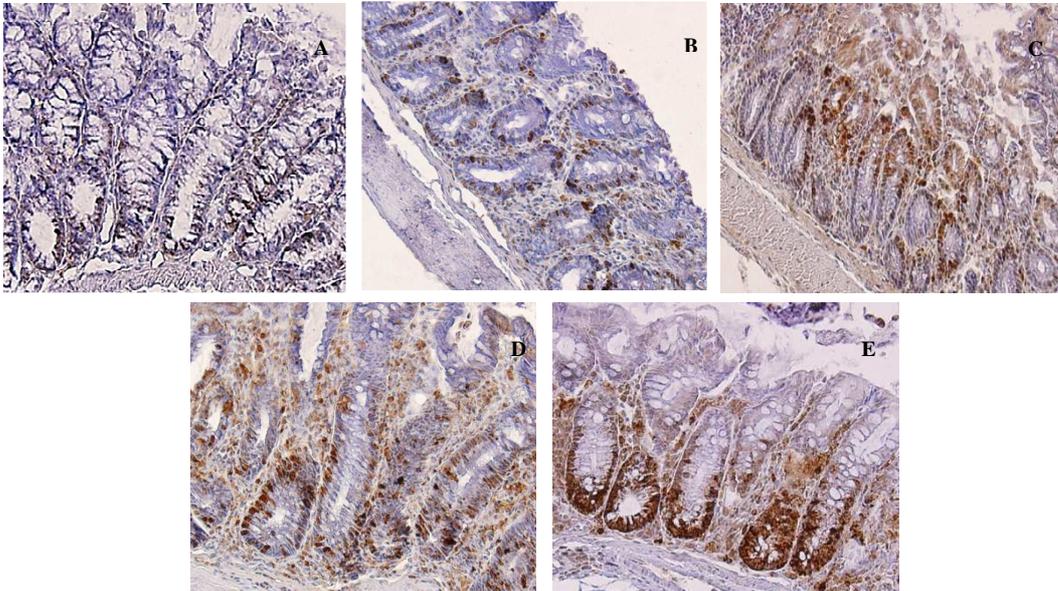


Figura 13. Expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* para IL-10 entre las 6 y 18 semanas de edad. En los animales sanos se detectó una expresión basal de PCNA (A). En los ratones IL-10^{-/-} el marcaje con el anticuerpo incrementó desde las 6 semanas de edad (B). La expresión de PCNA aumentó progresivamente tras las 10 y 14 semanas (C y D, respectivamente), siendo máxima a las 18 semanas (E). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4) y tienen una magnificación de 200x.

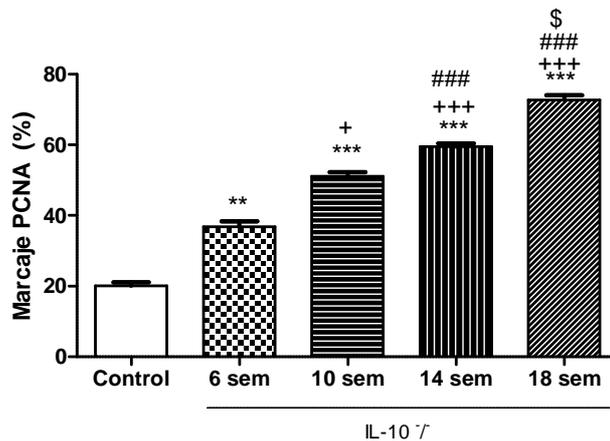


Figura 14. Índice de proliferación celular (%) en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* (KO) para IL-10 entre las 6 y 18 semanas de edad. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). (***) $p < 0.001$ y (**) $p < 0.01$ vs. control sano; (+) $p < 0.05$ y (+++) $p < 0.001$ vs. ratones KO de 6 semanas; (###) $p < 0.001$ vs. ratones KO de 10 semanas; (\$) $p < 0.05$ vs. ratones KO de 14 semanas.

2.4. Expresión génica del factor de necrosis tumoral- α y de sirtuína 1

El estudio de los niveles de expresión del ARNm de TNF- α y SIRT1 se realizó mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR).

El análisis de la expresión génica de TNF- α en la mucosa colónica mostró un incremento significativo en los niveles de esta citocina en todos los grupos de ratones deficientes en IL-10 en comparación con sus respectivos homólogos WT (**Figura 15**). Interesantemente, la expresión de TNF- α incrementó progresivamente en los ratones KO hasta las 14 semanas de edad, detectándose una marcada reducción a las 18 semanas.

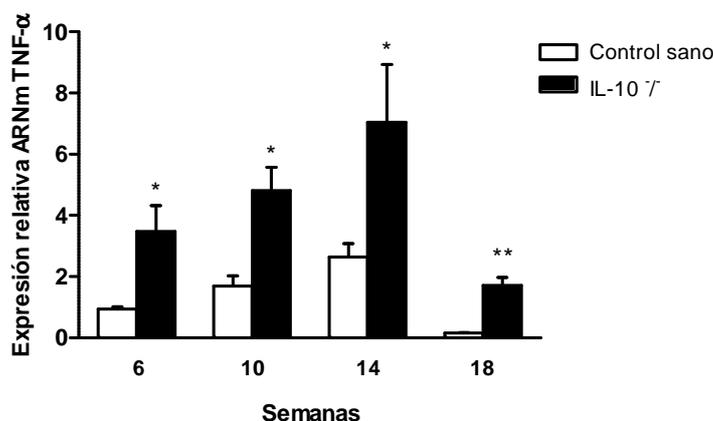


Figura 15. Expresión génica de la citocina factor de necrosis tumoral- α en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* para IL-10 de edades comprendidas entre las 6 y 18 semanas. Expresión relativa respecto al gen GAPDH empleando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. control sano.

El estudio de la expresión colónica de SIRT1 evidenció una marcada reducción en los niveles de esta proteína en todos los grupos de animales KO para IL-10 en relación con sus respectivos grupos control (**Figura 16**). A las 18 semanas, la expresión de esta proteína disminuyó también en el grupo de ratones control, no observándose diferencias significativas con los ratones KO en ese tiempo estudiado.

Estos resultados muestran una correlación inversa entre los niveles de expresión de la enzima SIRT1 y de la citocina TNF- α , confirmando el estado inflamatorio crónico en los ratones deficientes en IL-10.

Resultados

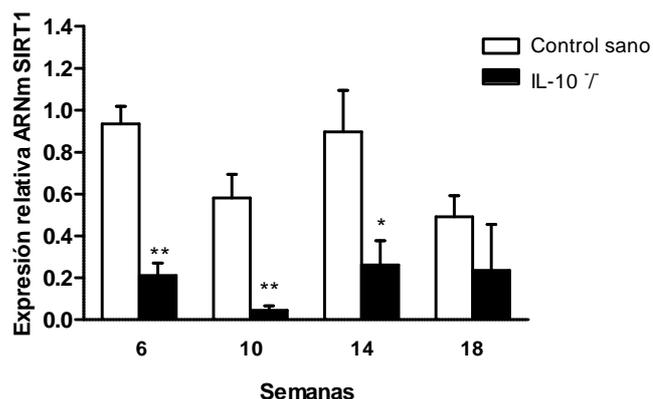


Figura 16. Expresión génica de sirtuina 1 (SIRT1) en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* para IL-10 de edades comprendidas entre las 6 y 18 semanas. Expresión relativa respecto al gen GAPDH empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. control sano.

2.5. Evaluación de la inducción de la autofagia y papel de la proteína cinasa activada por AMP

La determinación de la expresión de la proteína LC3-II es el método más utilizado para la medida de la activación de la autofagia, ya que esta proteína se encuentra presente en la membrana del autofagosoma. Los resultados del estudio de *Western Blot* mostraron un incremento en la expresión de LC3-II en el colon de los ratones KO a partir de las 10 semanas de edad, niveles que se mantuvieron elevados hasta las 18 semanas (**Figura 17**).

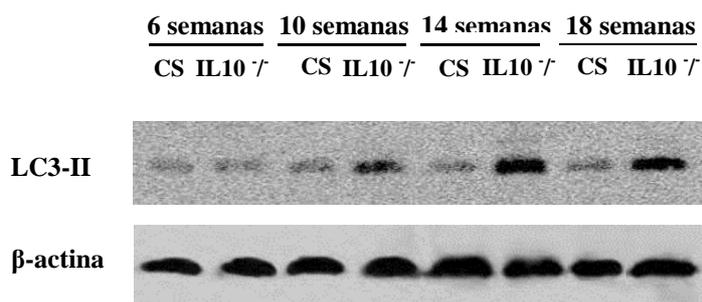


Figura 17. Expresión de la proteína LC3-II en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* KO para IL-10 de edades comprendidas entre las 6 y 18 semanas. La proteína β -actina fue usada como control de carga en el estudio de *Western Blot*. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4).

El estudio inmunohistoquímico del marcador de autofagia Beclin 1 mostró en los ratones sanos una expresión moderada en el epitelio superficial de la mucosa colónica (**Figura 18 A**). Por el contrario, se detectó un incremento en la inmunoreactividad para

esta proteína en los animales deficientes en IL-10 a partir de las 6 semanas de edad. La expresión de Beclin se extendió por toda la mucosa colónica tras las 10 y 14 semanas (**Figura 18 C y D**, respectivamente), siendo máxima en los animales de 18 semanas (**Figura 18 E**).

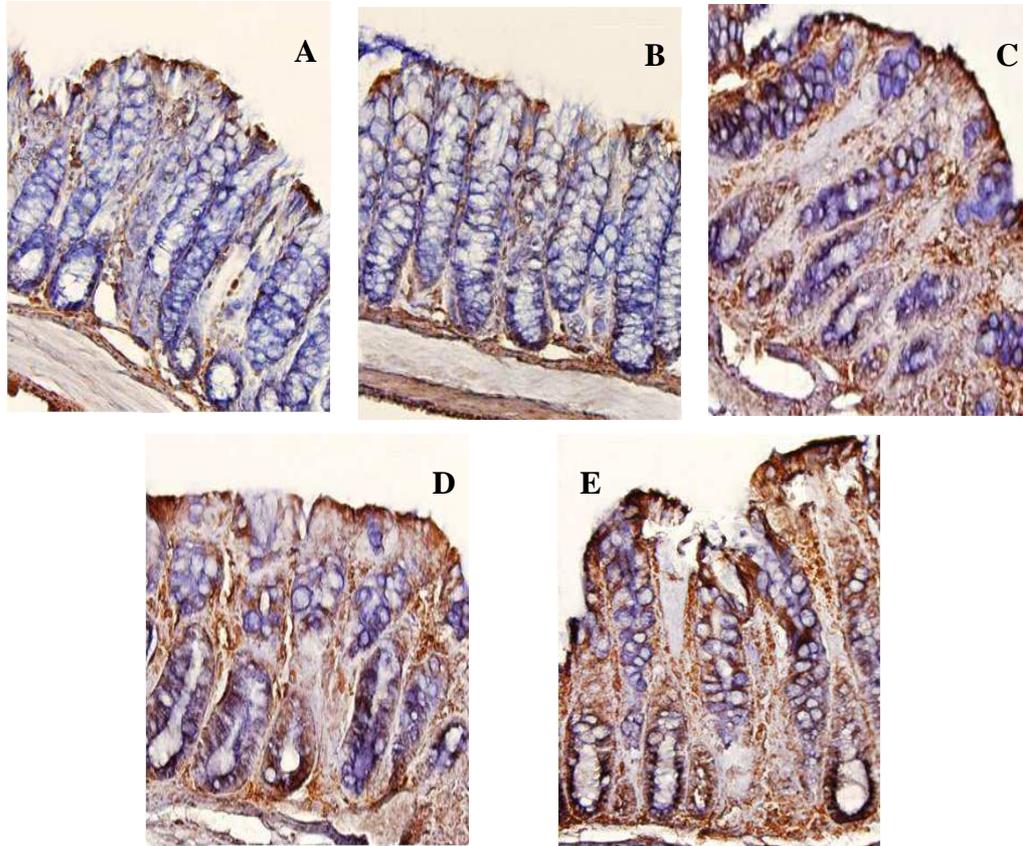


Figura 18. Expresión de Beclin 1 en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* para IL-10 entre las 6 y 18 semanas de edad. En los ratones control se detectó una expresión basal de Beclin 1 (A). En los animales IL 10^{-/-} el marcaje con el anticuerpo incrementó a partir de las 6 semanas (B). La expresión aumentó progresivamente a las 10 y 14 semanas (C y D, respectivamente), siendo máxima a las 18 semanas (E). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4) y tienen una magnificación de 200x.

El estudio de la expresión génica de Bcl-2, un gen inhibidor de la autofagia, evidenció una reducción significativa en los niveles de ARNm de Bcl-2 en los ratones IL-10^{-/-} a todas las edades en relación a sus respectivos grupos control (**Figura 19**).

En conjunto, los resultados anteriormente expuestos confirman una activación de la autofagia en todos los grupos de ratones deficientes en IL-10 estudiados, evidenciada por la acumulación de la proteína LC3-II, el incremento en la expresión de Beclin 1 y la disminución de los niveles de Bcl-2.

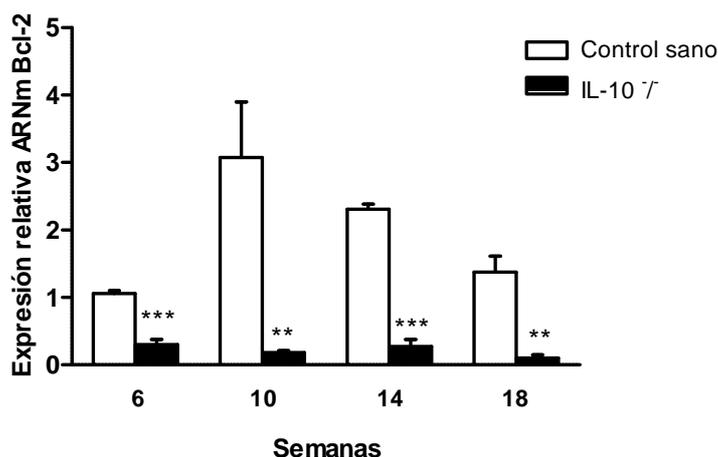


Figura 19. Expresión génica de Bcl-2 en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* (KO) para IL 10 de edades comprendidas entre 6 y 18 semanas. Expresión relativa respecto al gen GAPDH empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. control sano.

Para evaluar si la activación de la autofagia podría estar regulada por AMPK, se determinó la expresión de la proteína fosforilada (pAMPK), que es la forma activa de la enzima. El estudio de *Western Blot* reveló un marcado incremento en los niveles de fosforilación de AMPK en los ratones KO para IL-10 de todas las edades ensayadas, en relación con sus respectivos homólogos WT (**Figura 20**).

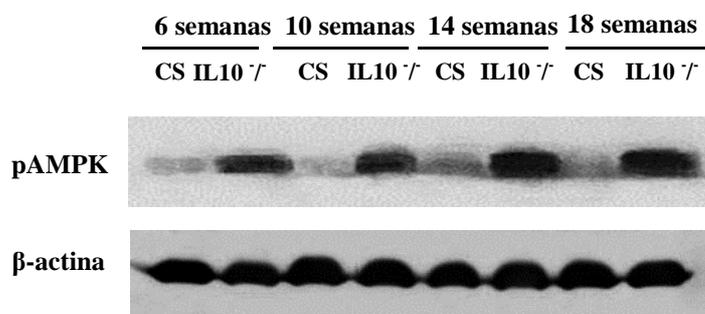


Figura 20. Expresión de la proteína cinasa activada por AMP fosforilada (pAMPK) en la mucosa colónica de ratones sanos y ratones *knockouts* para IL-10 de edades comprendidas entre las 6 y 18 semanas. La proteína β -actina fue usada como control de carga en el estudio de *Western Blot*. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4).

3. MODELO DE COLITIS ULCEROSA AGUDA INDUCIDA POR DEXTRANO SULFATO SÓDICO

Para este modelo se emplearon ratones C57BL/6 de 6 semanas de edad y 20 gramos de peso que recibieron DSS al 3% en el agua de bebida durante una semana. Determinados grupos de animales recibieron, además del DSS en el agua de bebida, resveratrol a la dosis de 50 mg/kg o bien un extracto de hojas de mango a las dosis de 50 y 100 mg/kg.

3.1. Valoración macroscópica de la colitis

La administración de DSS al 3% en el agua de bebida de los animales durante 7 días reprodujo una colitis aguda experimental con evidentes síntomas clínicos, tales como pérdida de peso de los animales. Este parámetro se representa en la **Figura 21** como el valor absoluto de la diferencia entre el peso final y el peso inicial. El grupo control sano apenas sufrió variaciones de peso, mientras que el grupo que tomó agua con DSS al 3% y no recibió ningún tratamiento presentó una marcada pérdida de peso corporal, llegando a perder más de un gramo como promedio de grupo ($p < 0.001$). Sin embargo, la administración de resveratrol a la dosis de 50 mg/kg y del extracto de hoja de mango a las dosis utilizadas de 50 y 100 mg/kg atenuó significativamente la pérdida del peso corporal ($p < 0.05$ vs. control DSS).

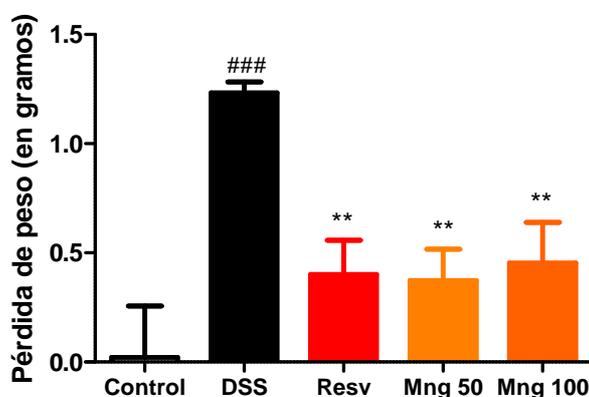


Figura 21. Pérdida de peso de ratones con colitis aguda producida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm error estándar ($n = 8-10$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (###) $p < 0.001$ vs. control sano; (**) $p < 0.01$ vs. control DSS.

El acortamiento de la longitud del colon fue seleccionado como parámetro morfológico de inflamación colónica. En la figura X se muestran fotografías representativas del colon de los distintos grupos de animales, una vez extraído. Como era de esperar, el grupo que sufrió un acortamiento más acusado fue el grupo control que únicamente recibió agua con DSS ($p < 0.001$ vs. control sano) (**Figura 23**). Sin

embargo, el tratamiento con los polifenoles, tanto resveratrol como el extracto de mango a las dos dosis ensayadas, consiguió paliar significativamente la reducción de la longitud del colon ($p < 0.05$ vs. control DSS).

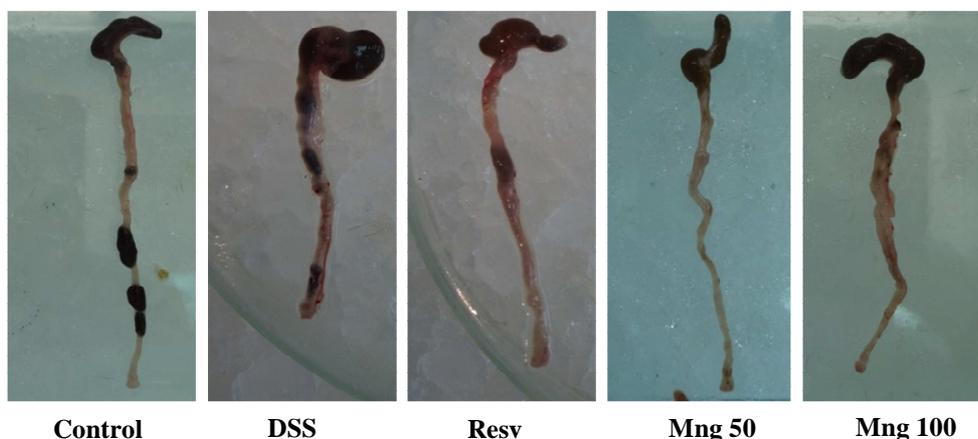


Figura 22. Aspecto macroscópico del colon de ratones con colitis aguda producida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg).

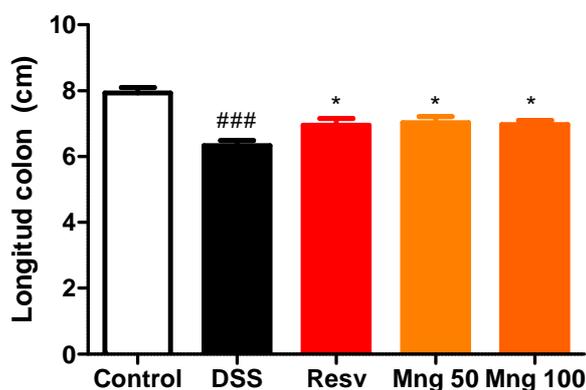


Figura 23. Longitud del colon de ratones con colitis aguda producida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm error estándar ($n=8-10$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (###) $p < 0.001$ vs. control sano; (*) $p < 0.05$ vs. control DSS.

3.2. Estudio histológico del daño colónico

La tinción con hematoxilina y eosina permitió evaluar la estructura del colon, poniendo de manifiesto una arquitectura normal de este tejido en los animales sanos (Figura XA). Por el contrario, las secciones procedentes de animales tratados con DSS revelaron múltiples lesiones que afectaron a toda la mucosa, apreciándose una pérdida

de la estructura histológica y una profunda alteración del epitelio glandular. Además, se detectó la presencia de fibroblastos, colágeno y un infiltrado inflamatorio leucocitario con granulocitos, monocitos y macrófagos en la mucosa y submucosa. Dicha capa aparece engrosada y con gran cantidad de hemorragia (**Figura 24 B**).

El estudio histológico del colon de los ratones que recibieron tratamiento con resveratrol o extracto de hoja de mango confirmó la mejoría observada macroscópicamente. Así, en estos animales, se detectó una preservación de la estructura glandular y una disminución del infiltrado inflamatorio con respecto al control DSS, así como un menor tamaño de la capa necrótica superficial (**Figuras 24 C-E**).

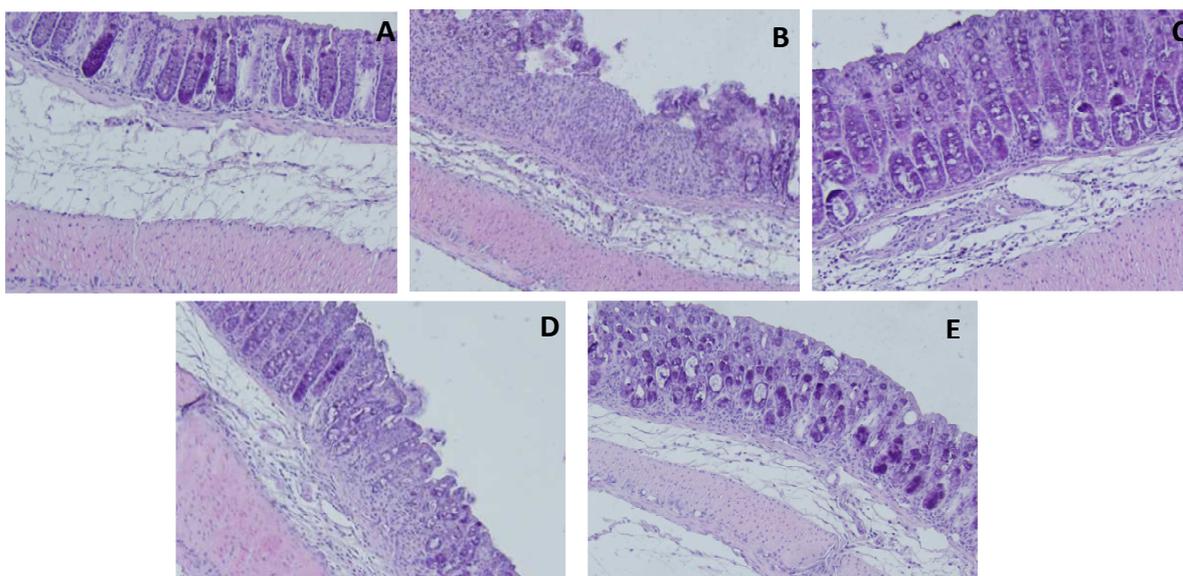


Figura 24. Tinción con hematoxilina y eosina de cortes histológicos de colon de ratones sanos (A), tratados con dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) (B), tratados con DSS y resveratrol (Resv 50 mg/kg) (C) y tratados con DSS y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg) (D y E, respectivamente). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4) y tienen una magnificación de 100x.

Para estudiar la preservación del epitelio y la producción de moco se realizó una tinción con azul alcian en todos los grupos ensayados. La tinción de las secciones histológicas del colon de los animales sanos mostró una estructura epitelial glandular normal con una marcada producción de moco, que presumiblemente actúa como protección del propio epitelio (**Figura 25 A**). Por el contrario, los animales que tomaron únicamente DSS en el agua de bebida sufrieron una desestructuración glandular y, por consiguiente, una disminución en la producción de moco (**Figura 25 B**). En las muestras procedentes de animales tratados con resveratrol y extracto de hoja de mango se detectó un epitelio glandular más preservado y una marcada producción de moco (**Figura 25 C-E**). Este efecto fue más evidente tras la administración del extracto de mango a la dosis de 100 mg/kg.

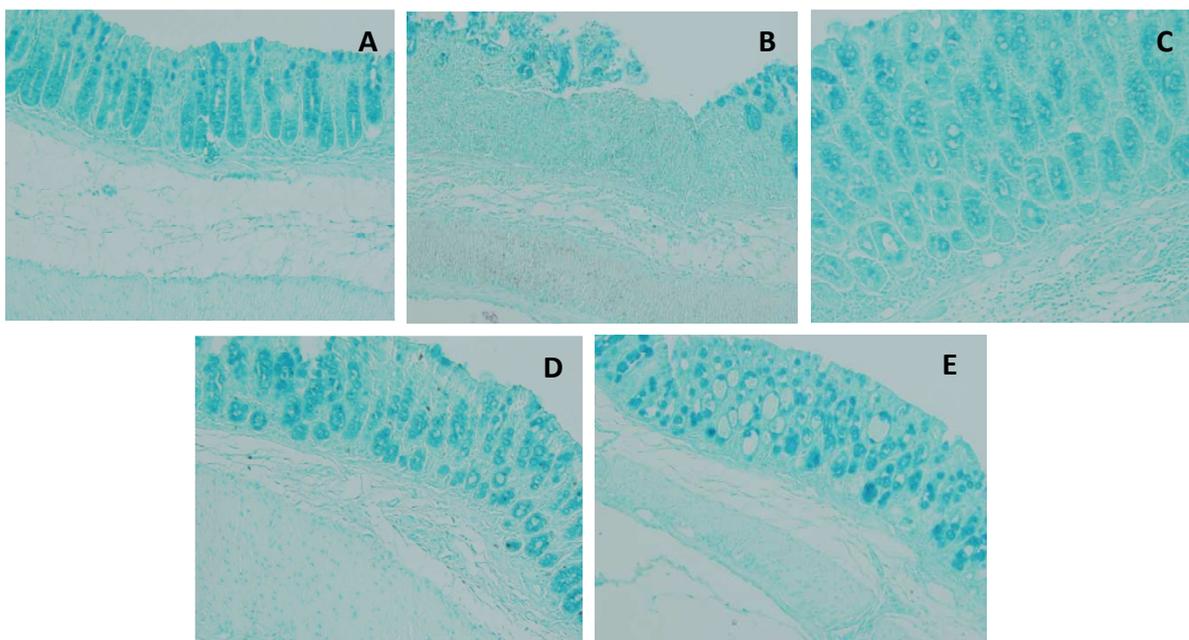


Figura 25. Tinción con azul alcian de cortes histológicos de colon de ratones sanos (A), tratados con dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) (B), tratados con DSS y resveratrol (Resv 50 mg/kg) (C) y tratados con DSS y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg) (D y E, respectivamente). Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4) y tienen una magnificación de 100x.

3.3. Análisis bioquímico de la mucosa colónica

3.3.1. Actividad de la enzima mieloperoxidasa

Los resultados de este estudio colorimétrico, como medida directa del grado de infiltración neutrofílica en las muestras de mucosa colónica, indicaron que en el grupo tratado con DSS aumentó significativamente la actividad enzimática MPO con respecto a los animales sanos ($p < 0.01$) (**Figura 26**). Tanto el tratamiento con 50 mg/kg de resveratrol, como las dos dosis del extracto de hoja de mango ensayadas (50 y 100 mg/kg) atenuaron significativamente el valor de este parámetro bioquímico respecto al grupo control DSS.

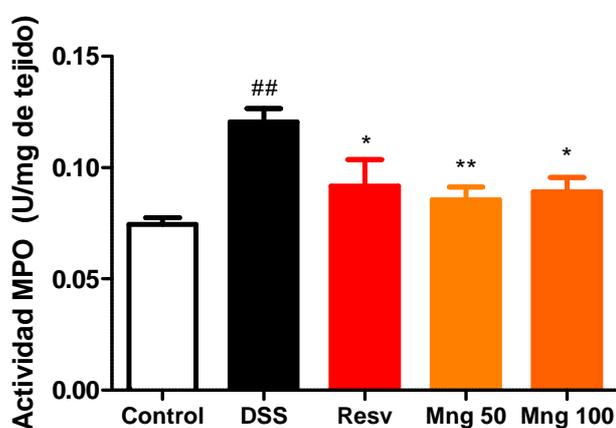


Figura 26. Actividad enzimática de la mieloperoxidasa en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=6). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (##) $p < 0.01$ vs. control sano; (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. control DSS.

3.3.2 Producción de las citocinas factor de necrosis tumoral- α e interleucina 6

Los niveles de producción de las citocinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 en muestras de mucosa colónica se determinaron mediante la técnica de ELISA.

Los resultados correspondientes a la producción de TNF- α pusieron de manifiesto un incremento significativo de los niveles de esta citocina en el grupo que recibió DSS respecto al grupo control sano ($p < 0.01$). La administración oral de resveratrol produjo una reducción muy marcada en la producción de esta citocina en relación al grupo control DSS ($p < 0.01$), alcanzándose valores por debajo de los detectados en los animales sanos. De manera similar, el extracto de mango, a las dosis ensayadas de 50 y 100 mg/kg, consiguió disminuir significativamente los niveles de TNF- α hasta casi los valores del grupo sano ($p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente) (**Figura 27**).

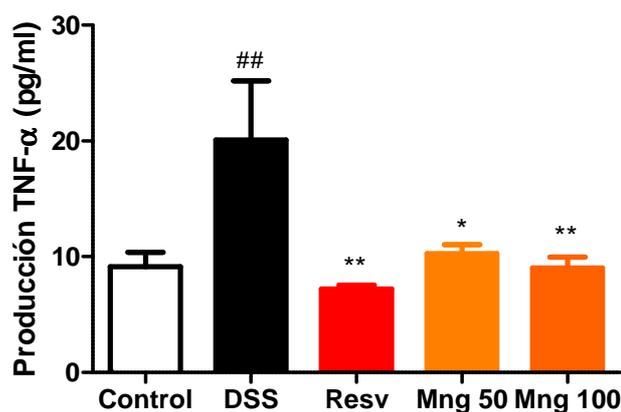


Figura 27. Niveles de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α , pg/mg tejido) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=6). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (##) $p < 0.01$ vs. control sano; (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. control DSS.

Los resultados obtenidos tras la cuantificación de los niveles de la interleucina 6 (IL-6) mostraron la misma tendencia. Nuevamente, en el grupo DSS se detectó una mayor producción de esta citocina en relación a los ratones sanos ($p < 0.01$). Por el contrario, los distintos tratamientos consiguieron reducir los niveles de IL-6 hasta valores próximos al grupo control sano (**Figura 28**).

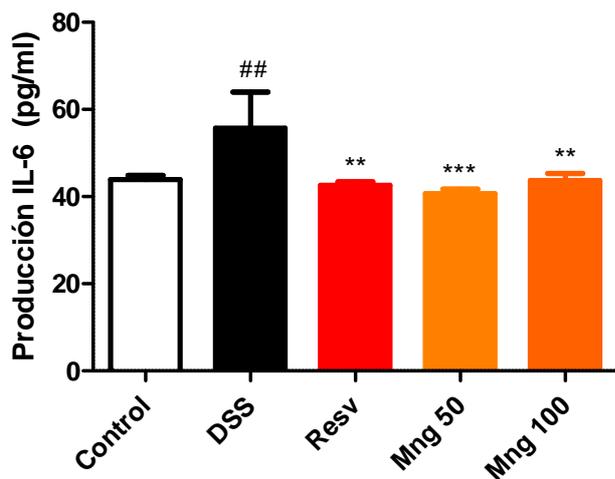


Figura 28. Niveles de interleucina 6 (IL-6, pg/mg tejido) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=6). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (##) $p < 0.01$ vs. control sano; (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$ vs. control DSS.

3.3.3 Expresión proteica de la ciclooxygenasa-2, la sirtuína 1 y la proteína cinasa activada por AMP fosforilada

La expresión de las proteínas COX-2, SIRT1 y pAMPK se determinó mediante la técnica de *Western Blot* y los resultados se muestran en las **Figuras 29**.

Los niveles de expresión de la enzima COX-2 fueron muy elevados en el colon de los ratones sometidos a colitis aguda por DSS respecto a los animales control sano ($p < 0.05$), en los que esta proteína se detectó a niveles basales. Tras el tratamiento con resveratrol y el extracto de hoja de mango a la dosis de 50 mg/kg no se detectaron cambios significativos en la expresión de COX-2 respecto al grupo control DSS. Sin embargo, el extracto de mango a la dosis mayor utilizada (100 mg/kg) sí fue capaz de reducir de manera significativa los niveles de esta proteína ($p < 0.05$), alcanzándose valores próximos al grupo control sano (**Figura 29**).

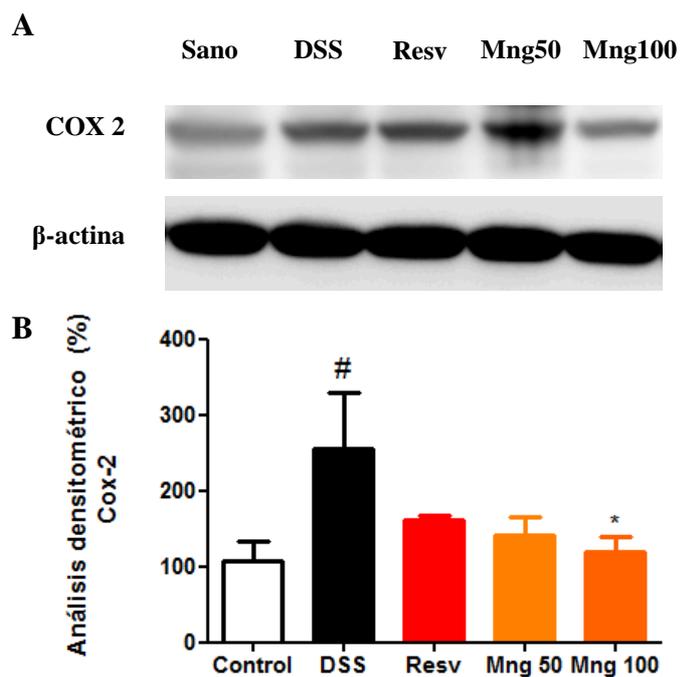


Figura 29 Expresión de la proteína ciclooxygenasa-2 (COX-2) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). La expresión se midió mediante *Western Blot* (A). El análisis densitométrico fue valorado comparándolo con el gen control de β -actina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni (B). (#) $p < 0.05$ vs. control sano; (*) $p < 0.05$ vs. control DSS.

Los resultados correspondientes a la expresión de SIRT1 y pAMPK no mostraron cambios en los niveles de estas proteínas entre los animales control sano y los que únicamente recibieron DSS. Sin embargo, los ratones tratados con resveratrol o el extracto de hoja de mango a las dos dosis ensayadas experimentaron un marcado incremento en la expresión de ambas enzimas (**Figura 30**).

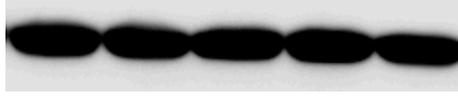


Figura 30. Expresión de la proteína sirtuína 1 (SIRT1) y la proteína cinasa activada por AMP fosforilada (pAMPK) en la mucosa colónica de ratones con colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS 3% p/v) y tratados con resveratrol (Resv 50 mg/kg) y un extracto de hoja de mango (Mng 50 y 100 mg/kg). La expresión se midió mediante *Western Blot* (A). El análisis densitométrico de los niveles de SIRT1 (B) y pAMPK (C) fue valorado comparándolo con el gen control de β -actina. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=4). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (*) p<0.05, (**) p<0.01 y (***) p<0.001 vs. control DSS.

4. ESTUDIO DE DIFERENTES POLIFENOLES EN EL MODELO DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

4.1. Efecto de la metformina sobre los gusanos mutantes *ire-1*

Las investigaciones desarrolladas empleando el organismo modelo *Caenorhabditis elegans* surgen de la colaboración con la empresa biotecnológica Bionaturis y el Dr. Manuel Muñoz Ruíz del Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica de la Universidad Pablo de Olavide. Los primeros estudios realizados permitieron comprobar que el mutante *ire-1* es un gusano obeso, ya que la tinción *Oil Red O* evidenció el acúmulo de mayor cantidad de triglicéridos en estos gusanos mutantes en comparación con los gusanos control N2 ($p < 0.05$) (**Figura 31**).

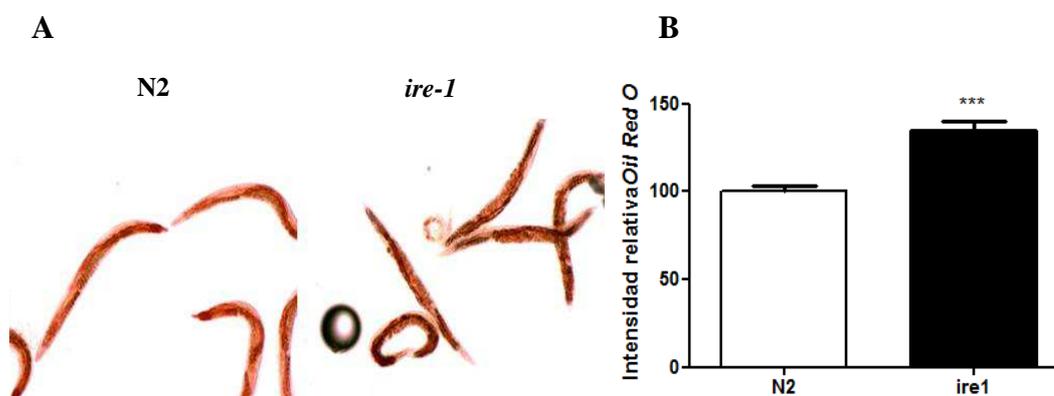


Figura 31. Gusanos *wild type* (*N2*) y mutantes *ire-1* teñidos con *Oil Red O* en estado L4. Magnificación 100x (A). Cuantificación de la intensidad de la tinción *Oil Red O* mediante el programa Image J (B). Los datos han sido normalizados respecto al control *N2* y se expresan como la media \pm error estándar ($n=20$). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (*) $p < 0.05$ vs. control *N2*.

A continuación, se determinó el efecto del tratamiento con metformina (100 mM) sobre los niveles de triglicéridos en los gusanos *N2* e *ire-1*. Los resultados de la cuantificación de la tinción con *Oil Red O* pusieron de manifiesto una reducción significativa en el acúmulo de triglicéridos tras la administración de metformina en ambas cepas ensayadas en comparación con su control respectivo sin tratamiento ($p < 0.001$) (**Figura 32**).

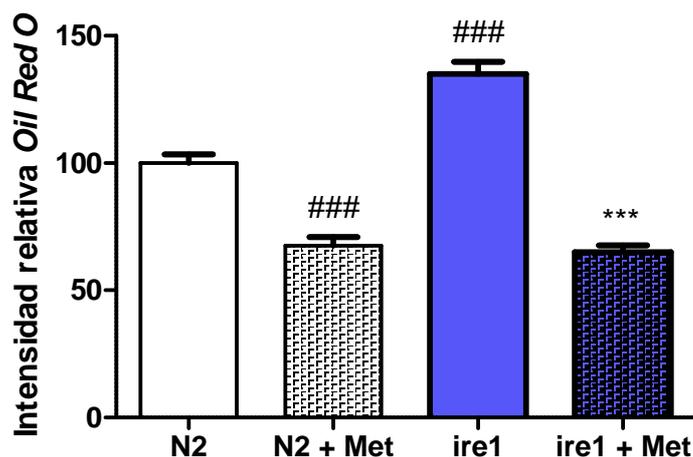


Figura 32. Intensidad de la tinción con *Oil Red O* de gusanos *wild type* N2 y mutantes *ire-1* en estado L4 en ausencia o presencia de metformina (Met) 100 mM. Los datos han sido normalizados respecto al control N2 y se expresan como la media \pm error estándar (n=20). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (###) $p < 0.001$ vs. control N2; (***) $p < 0.001$ vs. *ire-1*.

4.2. Efecto de la metformina en la expresión génica de las lipasas FIL-1 y FIL-2 (*Fasting Induced Lipase*) en los gusanos mutantes *ire-1*

El gen *ire-1* está involucrado en la respuesta de proteínas desplegadas, así como en la activación de las lipasas FIL-1 y FIL-2 (Jo y col., 2009). Los resultados del estudio de la expresión génica de FIL-1 y FIL-2 evidenciaron una marcada disminución en el ARNm de ambas lipasas en el mutante *ire-1* en relación al gusano silvestre. Concretamente, la expresión de FIL-1 sólo llegó a alcanzar niveles del 16.5% y la de FIL-2 del 20%.

La administración de metformina a la concentración de 100 mM no modificó de manera significativa los niveles de ambas lipasas en el tipo silvestre. Sin embargo, este compuesto, en el fenotipo obeso, fue capaz de incrementar significativamente la expresión de estas enzimas en comparación con los gusanos *ire-1* que no recibieron tratamiento, aunque no se llegaron a alcanzar los niveles del control N2 (**Figura 33**).

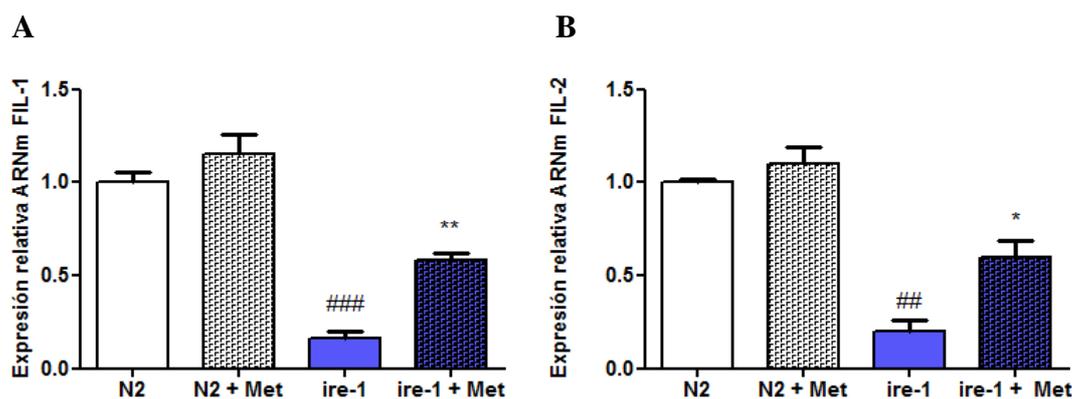


Figura 33. Cuantificación de ARNm de las lipasas FIL-1 (A) y FIL-2 (B) en gusanos silvestres (N2) y mutantes *ire-1* en estado L4-adulto, en ausencia y presencia de metformina (Met) a la concentración de 100 mM. Expresión relativa respecto al gen ACT-1 empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (##) $p < 0.01$ y (###) $p < 0.001$ vs. control N2; (*) $p < 0.05$ y (**) $p < 0.01$ vs. *ire-1*.

4.3. Efecto de la metformina en la expresión génica de sirtuína en los gusanos mutantes *ire-1*

El estudio de expresión de ARNm de SIR2.1 reveló una expresión basal de esta enzima en los gusanos *wild type* así como en los mutantes obesos *ire-1*, siendo la expresión en estos últimos ligeramente menor. En cambio, el tratamiento con metformina a la concentración de 100 mM incrementó significativamente los niveles de SIR2.1 en las dos cepas ($p < 0.01$) en comparación con los gusanos que no recibieron el compuesto (**Figura 34**).

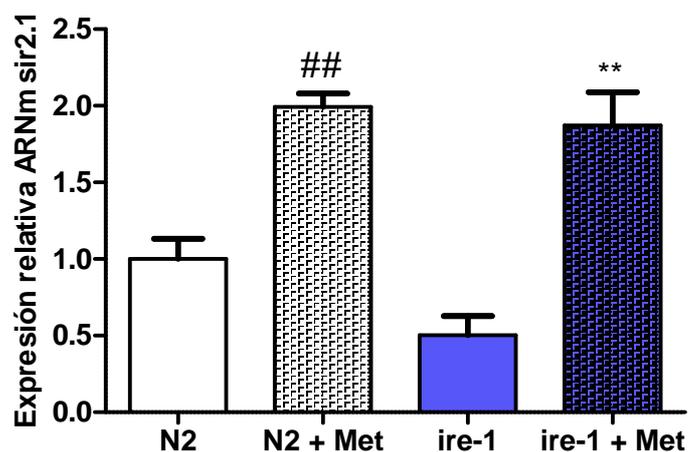


Figura 34. Cuantificación de ARNm de sir2.1 en gusanos silvestres (N2) y mutantes *ire-1* en estado L4-adulto, en ausencia y presencia de metformina (Met) a la concentración de 100 mM. Expresión relativa respecto al gen ACT-1 empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (##) $p < 0.01$ vs. control N2; (**) $p < 0.01$ vs. *ire-1*.

4.4. Efecto de la metformina en la expresión génica de *aak1* en los gusanos mutantes *ire-1*

Con el fin de conocer si el efecto de metformina sobre la regulación del fenotipo obeso, además de involucrar a sirtuínas, también dependía de AAK2 (homólogo a AMPK) se cuantificaron los niveles de la subunidad catalítica *aak1* α tras la administración de metformina (100 mM) en el gusano *wild type* y en el obeso (**Figura 35**). El tratamiento con metformina no produjo cambios significativos en la expresión génica de esta enzima en ninguna de las cepas estudiadas. Tampoco se apreciaron diferencias importantes en el mutante *ire-1* con respecto al silvestre N2.

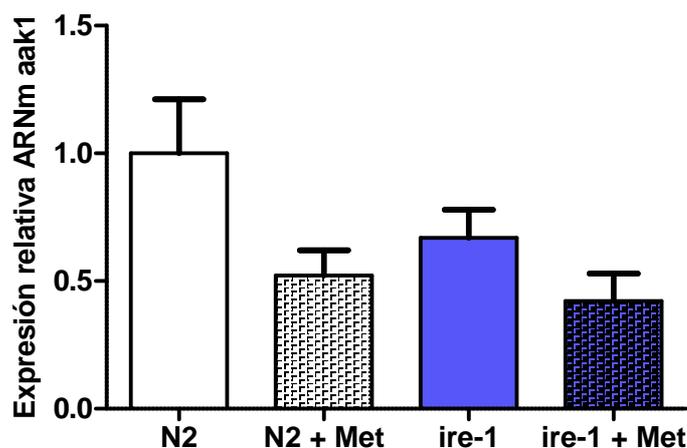


Figura 35. Cuantificación de ARNm de *aak1* en gusanos silvestres (N2) y mutantes *ire-1* en estado L4-adulto, en ausencia y presencia de metformina (Met) a la concentración de 100 mM. Expresión relativa respecto al gen ACT-1 empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni.

4.5. Efecto de la metformina en la expresión génica de sirtuína en los gusanos mutantes *aak2*

Para confirmar que la regulación de sirtuínas por parte de la metformina en los mutantes *ire-1* es independiente de *aak2*, se cuantificó la expresión de sirtuína 2.1 en unos mutantes para este gen (**Figura 36**).

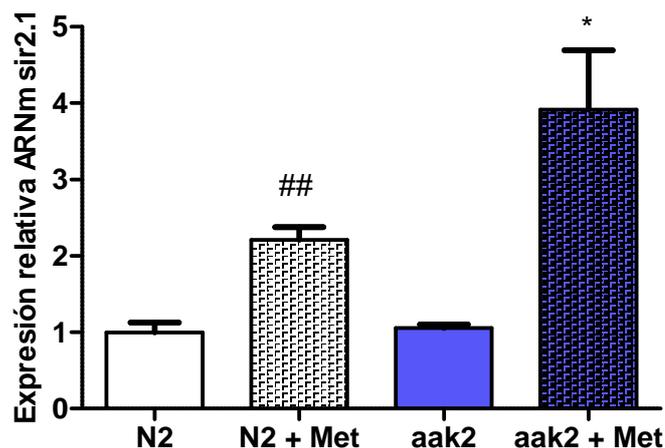


Figura 36. Cuantificación de ARNm de *sir2.1* en gusanos silvestres (N2) y mutantes *aak2* en estado L4-adulto, en ausencia y presencia de metformina (Met) a la concentración de 100 mM. Expresión relativa respecto al gen ACT-1 empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (##) $p < 0.01$ vs. control N2; (*) $p < 0.05$ vs. *aak2*.

4.6. Efecto del resveratrol en la acumulación de triglicéridos y la expresión génica de las lipasas FIL-1 y FIL-2

Los resultados anteriores sugieren que el mecanismo por el cual la metformina reduce la acumulación de triglicéridos involucra a las lipasas FIL-1 y FIL-2 en el fenotipo obeso, así como a *sir2.1* en los gusanos *wild type* y mutantes obesos.

El siguiente paso fue ensayar el efecto del resveratrol en la acumulación de triglicéridos en la cepa silvestre y en un mutante *sir2.1*. La tinción *Oil Red O* mostró que el resveratrol a una concentración de 100 μ M redujo significativamente el contenido de triglicéridos en los gusanos N2 ($p < 0.001$), mimetizando los efectos de la metformina a 100 mM descritos anteriormente (**Figura 37 A**). En cambio, en el mutante *sir2.1* el tratamiento con metformina o resveratrol no modificó la intensidad de la tinción con respecto al mutante *sir2.1* que no recibió ningún tratamiento, confirmando que los efectos del resveratrol y la metformina eran dependientes de sirtuínas (**Figura 37 B**). En la **figura 38** se muestran fotografías representativas de las tinciones realizadas.

Resultados

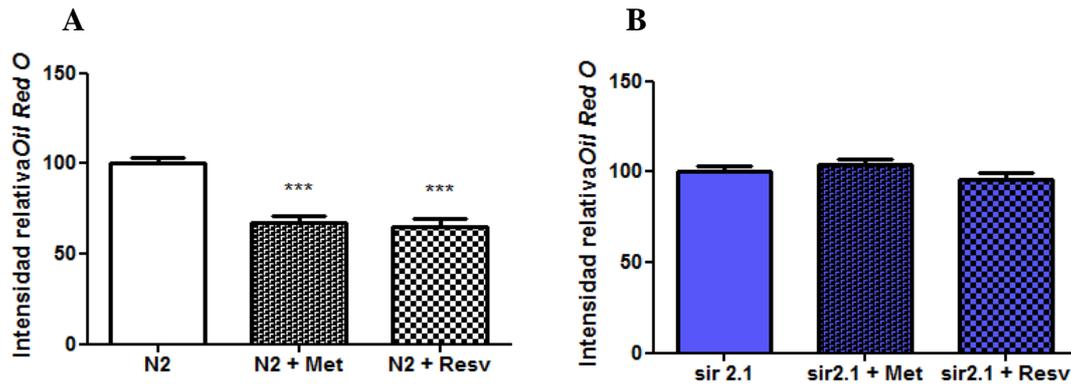


Figura 37. Cuantificación de la intensidad de la tinción *Oil Red O* de gusanos *wild type* N2 (A) y mutantes *sir2.1* en estado L4 (B) tras el tratamiento con metformina (Met) 100 mM o resveratrol (Resv) 100 μ M. Los datos han sido normalizados respecto al control N2 o al control Sirt 2.1 y se expresan como la media \pm error estándar (n=30). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni. (***) $p < 0.001$ vs. control N2.



Figura 38. Tinción con *Oil Red O* de gusanos *wild type* N2 y mutantes *sir2.1* en estado L4 en presencia de metformina (Met) 100 mM o resveratrol (Resv) 100 μ M. Las imágenes son representativas de cuatro experimentos independientes (n=4). Magnificación 100x.

El análisis de la expresión génica de las lipasas FIL-1 y FIL-2 mostrado en el apartado 4.2. reveló que la metformina no incrementaba los niveles de estas lipasas en el gusano *wild type*, efecto que sí ocurría en el mutante *ire-1*. En este nuevo estudio se evaluó el efecto de la metformina y del resveratrol sobre la expresión de las lipasas tanto en la cepa N2 como en el mutante *sir2.1*. Como se observa en la **Figura 39**,

ninguno de estos compuestos modificó de manera significativa los niveles de ARNm de FIL-1 y FIL-2 en ninguna de las cepas ensayadas.

Estos resultados sugieren que el efecto adelgazante de la metformina y del resveratrol en los gusanos N2 es dependiente de sirtuínas y no está mediado por las lipasas FIL1 y FIL2.

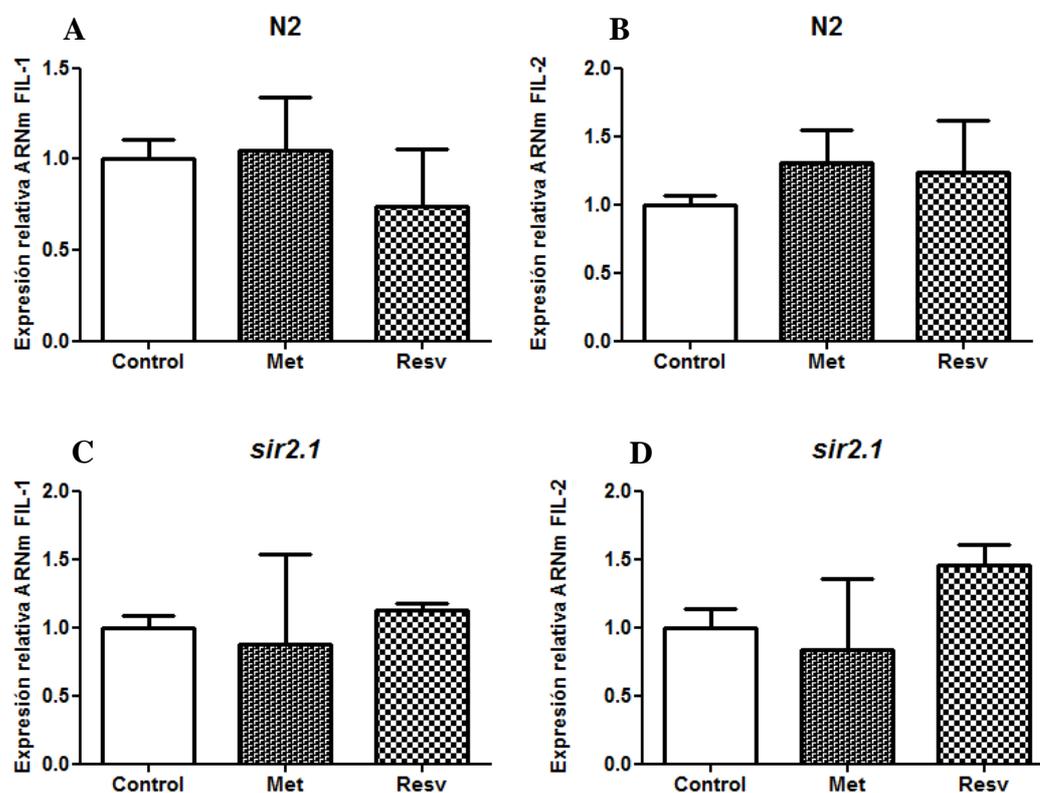


Figura 39. Cuantificación de ARNm de FIL-1 y FIL-2 en gusanos silvestres (N2) y mutantes *sir2.1* en estado L4-adulto, en ausencia y presencia de metformina (Met) 100 mM o resveratrol (Resv) 100 μM en estado L4. Expresión relativa respecto al gen ACT-1 empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se expresan como la media ± error estándar (n=3). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni.

4.7. Efecto del extracto de hoja de mango en *C. elegans*

Los ensayos que se presentan a continuación, evaluando el efecto del extracto de hojas de mango en la longevidad, longitud del cuerpo y bombeo faríngeo del nematodo, han sido llevados a cabo en una estancia predoctoral de 3 meses de duración en la Humboldt-Universität de Berlín, en el grupo del Dr. Christian E. W. Steinberg.

La Figura X muestra las curvas de supervivencia de los gusanos N2 y los mutantes *sir2.1* tratados con el extracto de hojas de mango a las concentraciones de 50 y 200 μg/mL, comparadas con sus respectivos gusanos control (sin tratamiento). Se puede observar un ligero aumento en la longevidad de los gusanos N2 tratados con el extracto de mango en relación a los gusanos sin tratamiento (**Figura 40 A**). La media de vida de los gusanos tratados con el extracto de hoja de mango, tanto a 50 como a 200 μg/mL aumentó a 16 días en comparación con los 14 días del grupo control. Estos cambios en

las curvas de supervivencia y la vida media no fueron detectados en la cepa *sir2.1* (Figura 40 B).

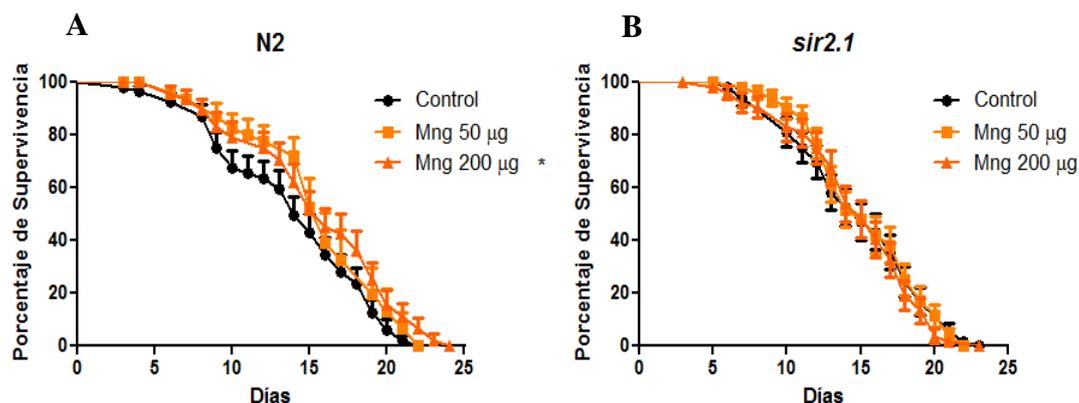


Figura 40. Curvas de longevidad de *C. elegans* en presencia del extracto de hojas de mango a 50 y 200 µg/mL en la cepa silvestre N2 (A) y el mutante *sir2.1* (B). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mantel-Cox.

A continuación, se evaluó el efecto del extracto de hojas de mango a las concentraciones ensayadas de 50 y 200 µg/mL sobre la longitud de los gusanos N2 y los mutantes *sir2.1* al sexto día de adulto. Diariamente se fue comprobando el desarrollo de los gusanos a fin de detectar cualquier anomalía como retraso en el ciclo de vida o reducción de la motilidad, además de cualquier parámetro que pudiera indicar toxicidad. En este sentido, no se registró ningún síntoma de toxicidad por parte del extracto durante el desarrollo de todos los experimentos. En la **Figura 41** se puede comprobar que el tratamiento con el extracto de hojas de mango redujo de forma significativa el tamaño corporal de los gusanos N2, mientras que el mutante *sir2.1* no sufrió cambios en la longitud.

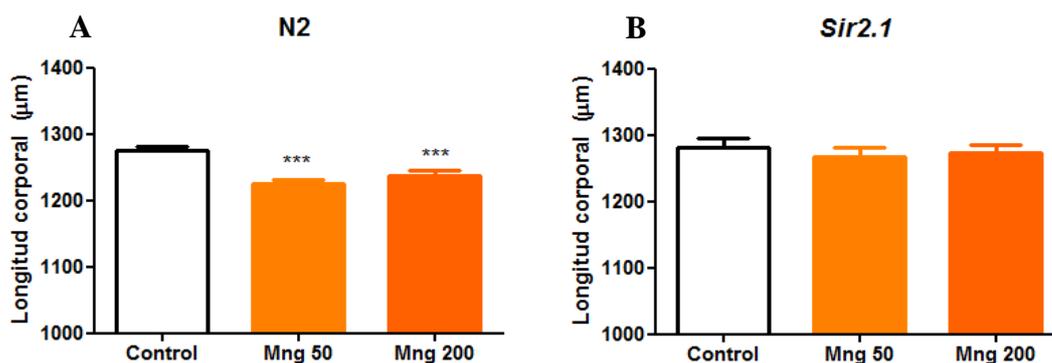


Figura 41. Longitud corporal de los gusanos al sexto día de adultos en presencia de extracto de hojas de mango a 50 y 200 µg/mL en cepa silvestre N2 (A) y mutante *sir2.1* (B). Los datos se expresan como la media ± error estándar (n=60). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni.

Para evaluar si el extracto de mango podría reducir la ingesta de alimento, lo que daría lugar a un incremento de la longevidad directamente relacionado con la restricción calórica, se cuantificó el bombeo faríngeo de los gusanos N2 y los mutantes *sir2.1*. Se contabilizó el número de veces que los nematodos realizaban el movimiento de bombeo por minuto en ambas cepas tratadas con el extracto de mango a las dosis de 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$ al sexto día de adulto (**Figura 42**). Los resultados de este estudio mostraron diferencias significativas en el bombeo faríngeo tras el tratamiento con el extracto en los gusanos N2, mientras que el efecto desaparecía en los mutantes. Se confirmaron por tanto que los efectos del extracto son sirtuina dependientes.

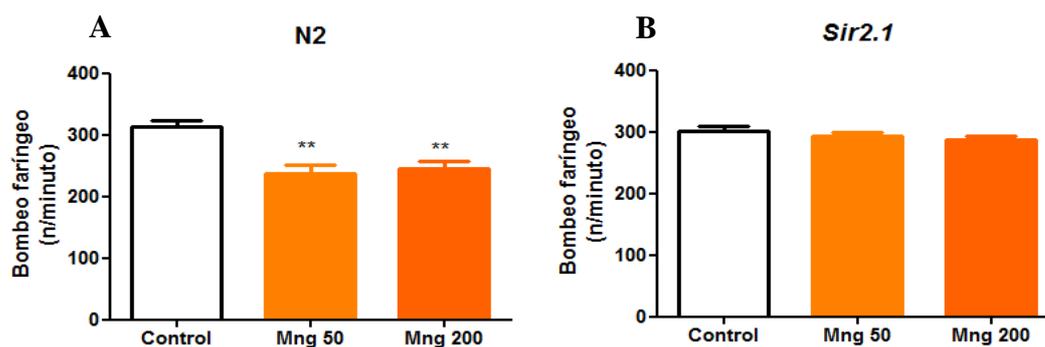


Figura 42. Bombeo faríngeo de los gusanos en presencia de extracto de hojas de mango a 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$ en la cepa silvestre N2 (A) y el mutante *sir2.1* (B). Los datos se expresan como la media \pm error estándar (n=60). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA, seguido de un test de Bonferroni.

DISCUSIÓN

La EII es una patología crónica y reiniciante con etiología aún desconocida, que afecta a un importante y creciente número de personas a nivel mundial, siendo más notable en países con un alto nivel de desarrollo industrial. Esta enfermedad abarca tanto a la CU como a la EC. En la actualidad se considera que la EII se desarrolla como consecuencia de una respuesta inadecuada y exagerada del sistema inmune del individuo, que provoca una inflamación mantenida de la mucosa intestinal en individuos genéticamente susceptibles, como consecuencia de una interacción entre factores medioambientales, microbiológicos e inmunológicos. El tratamiento de estas patologías persigue la remisión clínica, mantener la nutrición y un desarrollo adecuado del individuo, así como la reducción del número y duración de las recaídas (Kaser y col., 2010, Grivennikov, 2013). Además, se sabe que la inflamación crónica es la principal causa del desarrollo de cáncer de colon en este grupo de pacientes.

En la actualidad se están evaluando nuevas alternativas en el tratamiento de enfermedades con base inflamatoria como la EII y el cáncer colorectal. La mirada está puesta en los productos naturales, que constituyen una fuente importante de compuestos base para el desarrollo de sustancias con interés terapéutico. En este sentido, los polifenoles son un grupo heterogéneo de compuestos químicos que comparten entre sí grupos fenoles en su estructura y que se encuentran en una gran variedad de alimentos, sobre todo en frutas y verduras. Estos compuestos han mostrado numerosos efectos beneficiosos para la salud debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, y antitumorales. Sin embargo, los mecanismos por los cuales estas moléculas ejercen sus acciones no están aun totalmente esclarecidos.

En base a estos antecedentes, el objetivo de nuestras investigaciones fue evaluar la actividad biológica de polifenoles clásicos, como el resveratrol y la quercetina, así como de extractos ricos en polifenoles, tales como un extracto de hojas de mango y otro de hojas de uva, en modelos celulares y animales, así como estudiar los posibles mecanismos implicados en sus efectos. En primer lugar, se llevaron a cabo estudios *in vitro* en una línea celular de adenocarcinoma de colon humano (HT-29) y una línea monocitaria de leucemia aguda humana (THP-1) para evaluar la actividad citotóxica y antiinflamatoria de los compuestos polifenólicos. Nuestros resultados confirmaron que ninguno de los polifenoles ensayados presentó actividad citotóxica a las dosis ensayadas. Algunos polifenoles sí han mostrado tener actividad frente a distintas líneas celulares (Sak, 2014). Además, el estudio de producción de TNF- α en macrófagos THP-1 mostró una importante reducción en los niveles de esta citocina en todos los compuestos ensayados (Leong y col., 2014, Risitano y col., 2014).

Por otro lado, numerosos datos de los últimos años avalan el interés de las sirtuínas como enzimas reguladoras de procesos fisiológicos importantes en el organismo como el envejecimiento o procesos metabólicos (Chung y col., 2010, Oliva y col., 2008, Camins y col., 2010). Además, se ha descrito el papel de SIRT1 como inhibidor de la inflamación a través de su interacción con NF κ B o la proteína activadora-1 y la consiguiente reducción en la producción de citocinas y COX-2,

respectivamente (Zhang y col., 2010, Yang y col., 2012). Debido a estas propiedades, esta proteína podría constituir una interesante diana farmacológica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Numerosas evidencias han mostrado que polifenoles como el resveratrol pueden ejercer sus efectos anti-envejecimiento, antioxidantes y antiinflamatorios debido a su función como activadores de sirtuínas (Chung y col., 2010). Por tanto, continuando con los ensayos *in vitro*, el siguiente paso fue analizar la expresión de SIRT1 tras la exposición a los polifenoles puros o a los extractos. Este estudio demostró que todos los polifenoles incrementaron los niveles de esta enzima en las líneas HT-29 y THP-1. Estos hallazgos sugieren que estos compuestos podrían presentar un efecto antiinflamatorio debido a la reducción en la producción de TNF- α y al incremento en los niveles de SIRT1.

En las últimas décadas la introducción de técnicas de manipulación genética en los laboratorios ha permitido el desarrollo de nuevos modelos experimentales. Uno de ellos es el modelo basado en ratones deficientes en IL-10^{-/-}, los cuales, cuando salen de un ambiente libre de patógenos y son mantenidos en condiciones normales, desarrollan enterocolitis crónica que, con el tiempo, puede derivar a cáncer de colon (Kanneganti y col., 2011). Con este punto de partida, el objetivo de nuestro primer estudio *in vivo* fue evaluar los cambios progresivos que se producen en la mucosa intestinal de ratones deficientes en IL-10, centrándonos en una fase temprana del proceso inflamatorio, previa al desarrollo del cáncer. Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron ratones *knockouts* para IL-10 de edades comprendidas entre las 6 y 18 semanas.

Los resultados de esta investigación confirmaron que los animales deficientes en IL-10 desarrollaron una colitis inflamatoria a partir de la sexta semana, cuya gravedad aumentó progresivamente a medida que la edad de los mismos avanzaba. Además, el análisis histológico mostró la presencia de lesiones displásicas a partir de las 10 semanas de edad, hallándose cierta correlación entre la gravedad de la displasia y el proceso inflamatorio previo. Sin embargo, ninguno de los animales IL-10^{-/-} desarrolló adenocarcinomas; la lesión más grave detectada fue displasia de alto grado. Nuestros resultados contrastan con estudios previos que sí han mostrado la presencia de adenocarcinomas en edades tempranas, es decir, a partir de los 2 meses, aunque con una incidencia baja (14%), que aumentó gradualmente con la edad, llegando a alcanzar el 65% a los 6 meses (Sturlan y col., 2001). Estas diferencias en el desarrollo de cáncer en el modelo de los ratones KO en IL-10 se podrían explicar en base a investigaciones previas que sugieren que la incidencia de adenocarcinomas depende de la cepa del ratón utilizada, así como del tipo de patógenos presentes en el ambiente (Kanneganti y col., 2011). Por otro lado, existen evidencias clínicas que muestran una mayor proliferación de las células colónicas epiteliales en pacientes con EII. Este estado hiperproliferativo, en condiciones de inflamación crónica, se ha relacionado con un mayor grado de displasia y cáncer de colon (Ierardi y col., 2001). El estudio de localización de PCNA confirmó la presencia de células en proliferación en todos animales deficientes en IL-10, aunque su expresión fue más intensa en los ratones KO de 18 semanas, que igualmente presentaron la mayor incidencia de displasia grave.

Se ha descrito en numerosas ocasiones que la inflamación crónica es el factor etiopatogénico principal del cáncer de colon asociado a colitis. Además de inducir la aparición de mutaciones en el ADN y alteraciones epigenéticas, el proceso inflamatorio desencadena la liberación, por parte de las células inmunes, de numerosos mediadores implicados en el desarrollo tumoral, tales como el TNF- α (Vendramini-Costa y Carvalho, 2012). Esta citocina tiene un papel clave en el crecimiento, promoción y metástasis del tumor. Se ha mostrado que la supresión génica de la subunidad p55 del receptor de TNF- α o bien la administración de fármacos anti-TNF- α inhibió el desarrollo de tumores en un modelo de cáncer de colon inducido por la administración de azoximetano y ciclos de DSS (Popivanova y col., 2008, Onizawa y col., 2009). El análisis de la expresión génica de TNF- α en la mucosa colónica de los ratones deficientes en IL-10 de nuestro estudio mostró un incremento progresivo en los niveles de esta citocina, presentando un máximo en los ratones de 14 semanas, para después disminuir. Estos resultados confirmarían el hecho de que este mediador se induce ya en una fase temprana, coincidente con el proceso inflamatorio, y está implicado en la génesis de la displasia y de los tumores, lo que confirmaría el interés de los tratamientos inhibidores para la prevención del CCR.

Con el objetivo de avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las lesiones displásicas, en un tejido previamente inflamado, hemos analizado los cambios de expresión de SIRT1, AMPK, y diferentes marcadores de autofagia tras un daño inflamatorio prolongado que promueve la complicación tumoral. Como ya sido expuesto, las sirtuínas juegan un importante papel en el control de la inflamación. Sin embargo, el papel de estas enzimas deacetilasas en cáncer está actualmente siendo debatido, ya que han mostrado tener una función tanto supresora como promotora del tumor. En relación a su actividad antitumoral, datos previos han demostrado que la sobreexpresión de SIRT1 en el intestino de ratones $Apc^{min/+}$, caracterizados por la presencia de una mutación en el gen supresor de tumores APC, redujo la formación de pólipos intestinales (Firestein y col., 2008). Además, clínicamente, se han detectado niveles disminuidos de SIRT1 en muestras de pacientes con adenocarcinomas de colon avanzados y en tejidos con metástasis (Jang y col., 2012). Por el contrario, en otros estudios quedó patente la actividad tumorigénica de SIRT1, ya que su expresión se encontró aumentada en diferentes lesiones colónicas, tales como pólipos, adenomas y neoplasia (Kriegel y col., 2012). Las investigaciones sobre cambios de expresión de SIRT1 en nuestro estudio demostraron por primera vez una marcada reducción en los niveles de esta proteína en el modelo de ratones deficientes en IL-10. Estos hallazgos apoyan el papel antiinflamatorio y antitumoral de las sirtuínas y sugieren que el descenso de SIRT1 en estos animales podría constituir un mecanismo del tejido inflamado para mantener la inflamación y promover el desarrollo de lesiones displásicas en el colon.

La autofagia es un proceso de mantenimiento celular altamente conservado que tiene como objetivo la eliminación y reciclaje de componentes celulares dañados

(Murrow y Debnath, 2013). Un mal funcionamiento de la autofagia se ha asociado con diversas enfermedades entre las que se encuentra la EII. En este sentido, estudios previos han mostrado que ratones deficientes en los genes reguladores de autofagia Atg16 o Atg7 fueron más susceptibles a desarrollar colitis que los ratones que no presentaban esas mutaciones (Saitoh y col., 2008, Inoue y col., 2012). Con respecto al cáncer, el papel de la autofagia es controvertido, ya que, al igual que se ha mencionado para las sirtuínas, este proceso puede tener efectos supresores o inductores del tumor. En relación a su efecto antitumoral, la autofagia sería una alternativa a la apoptosis para eliminar las células tumorales. Sin embargo, también se ha descrito que este proceso puede favorecer el crecimiento y la supervivencia de las células cancerosas en situaciones de estrés, tales como la falta de nutrientes y la hipoxia, que ocurren principalmente en las partes más internas del tumor (Kato y col., 2002). En estas condiciones, la activación de la autofagia parece estar regulada por AMPK, ya que esta enzima se induce tras un descenso en los niveles de ATP, como ocurre en situaciones de ayuno o hipoxia (Habeeb y col., 2011).

Estudios previos han demostrado que cuando se activa la autofagia tiene lugar la conversión de la proteína LC3-I, que se encuentra en el citosol, a LC3-II, localizada en la membrana del autofagosoma. Por tanto, la determinación de LC3-II es uno de los métodos más usados para la detección de la autofagia. Por otro lado, se ha descrito el papel de la proteína antiapoptótica Bcl-2 como inhibidor de autofagia por medio de su unión al dominio BH3 de Beclin, proteína requerida para el inicio de la formación del autofagosoma. Los resultados de este estudio mostraron una activación de la autofagia en todos los grupos de ratones deficientes en IL-10, evidenciada por la acumulación de la proteína LC3-II, el incremento en la expresión de Beclin 1 y la disminución de los niveles de Bcl-2. Nuestra hipótesis es que la inducción de la autofagia en las etapas iniciales de la colitis podría constituir un mecanismo del tejido inflamado para reducir la inflamación. No obstante, en las etapas más avanzadas de la enfermedad, la autofagia contribuiría a la transformación displásica del tejido colónico observada en este estudio.

Existen evidencias que demuestran que SIRT1 y AMPK se regulan de manera recíproca y que ambas enzimas son necesarias para la activación de la autofagia. En este sentido, SIRT1 incrementa los niveles de pAMPK al llevar a cabo la desacetilación de la actividad de LKB1 (Lan y col., 2008). Por otro lado, pAMPK aumenta los niveles de NAD⁺, cofactor requerido para la actividad desacetilasa de SIRT1, contribuyendo por tanto, a la activación de SIRT1 (Canto y col., 2009). Además, SIRT1 contribuye a la activación de la autofagia al desacetilar proteínas Atg (Lee y col., 2008). Los datos de nuestro estudio, encaminado a evaluar la conexión entre la vía SIRT1-AMPK-autofagia en un modelo de cáncer asociado a colitis, sugieren que la activación de la autofagia observada en los animales deficientes en IL-10 podría ser debida al incremento de la actividad de AMPK. Dado que SIRT1 y AMPK se regulan recíprocamente, cabría esperar que los niveles de SIRT1 estuvieran también aumentados en los ratones KO. Sin embargo, nuestros resultados han mostrado efectos contrarios, y desde el inicio del proceso. Nuestra interpretación es que dado el papel de SIRT1 en el control de la

inflamación, los bajos niveles detectados en el colon de los animales KO contribuirían al mantenimiento de la inflamación crónica y al desarrollo de displasia, acontecimientos que los mecanismos de reparación asociados a la activación de la autofagia no fueron capaces de corregir. En cualquier caso, es evidente que se necesita realizar más estudios para demostrar la relación SIRT1-AMPK-autofagia y su papel en la inflamación crónica y su evolución a cáncer, para así poder diseñar nuevas estrategias terapéuticas para estas patologías.

Numerosas investigaciones han descrito el efecto beneficioso de los polifenoles en distintos modelos experimentales de EII (Sanchez-Fidalgo y col., 2013, Salaga y col., 2014). En este sentido, estudios recientes han mostrado que el tratamiento con un extracto de corteza del tallo de *Mangifera indica* o con manguiferina mejoró los signos clínicos de la colitis inducida por DSS o TNBS (Dou y col., 2014, Jeong y col., 2014). Sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos moleculares asociados a estos efectos. Es por ello que llevamos a cabo un segundo estudio *in vivo* para evaluar el efecto de un extracto de hojas de mango, que contenía un 60% de manguiferina, en un modelo de colitis ulcerosa aguda por DSS, utilizando el resveratrol como polifenol de referencia.

Nuestros resultados mostraban que la administración de DSS al 3% en el agua de bebida de los animales durante 7 días reprodujo una colitis aguda experimental caracterizada por una importante pérdida de peso y acortamiento del colon. El análisis histológico mostró un engrosamiento de la pared intestinal producido por el infiltrado de células inflamatorias en la mucosa y submucosa. El tratamiento con el extracto de hojas de mango a las dos dosis utilizadas (50 y 100 mg/kg) inhibió significativamente la pérdida de peso corporal y el acortamiento del colon al mismo nivel que el resveratrol (50 mg/kg). Los datos microscópicos tras la administración del extracto confirmaron los resultados macroscópicos, reflejando una atenuación de la desestructuración de la mucosa y del edema.

Una marca característica de la EII es la fisiología alterada de las células caliciformes del intestino, encargadas principalmente de la producción de mucina, que cubre la mucosa intestinal formando una barrera mucosa. En este sentido, individuos con CU o EC presentan una gran disminución de este tipo de células y como consecuencia una menor producción de este moco protector (Heazlewood y col., 2008). El estudio histológico, mediante tinción con azul alcian, confirmó que en el grupo DSS se producía una gran pérdida de estas células. Sin embargo, en aquellos grupos de animales tratados con el resveratrol o el extracto de hojas de mango se observó una preservación de la estructura de la mucosa y una mayor acumulación de moco en las células caliciformes, lo cual sugiere un efecto protector de estos compuestos sobre el daño en el epitelio colónico.

La respuesta inflamatoria causada por DSS provoca la activación de células T colaboradoras tipo 1 (Th1), de forma similar a lo que ocurre en la CU, que inicia el

reclutamiento de macrófagos y neutrófilos (Hsiung y col., 2014). Estas células inmunes participan activamente en la inflamación mediante la producción de citocinas como el TNF- α , el cual lleva a cabo la amplificación de la cascada inflamatoria activando a otros mediadores, destruyendo enzimas y generando radicales libres que dañan el tejido (Amrouche-Mekkioui y Djerdjouri, 2012). En este sentido, el control del infiltrado de células inflamatorias y de la producción de estas citocinas es fundamental para la mejora de esta patología. En nuestro estudio, se confirmó cómo DSS aumentaba significativamente la actividad de la enzima MPO, utilizada como marcador de infiltración neutrofílica. Paralelamente, se detectaron niveles elevados de las citocinas TNF- α e IL-6 en la mucosa colónica. El tratamiento con el extracto de hojas de mango o con el polifenol de referencia redujo el grado de infiltración neutrofílica, hecho que está en consonancia con los datos histológicos obtenidos, así como la producción de TNF- α e IL-6. Hallazgos similares se han descrito en animales que sufrían colitis y que fueron tratados con manguiferina (Dou y col., 2014, Jeong y col., 2014). Por otro lado, numerosas evidencias han mostrado que la enzima inducible COX-2 se encuentra incrementada en la EII generando numerosos productos que agravan el proceso patológico (Sanchez-Fidalgo y col., 2014, Hasnat y col., 2014). En nuestras investigaciones se observó que el tratamiento con el extracto de hoja de mango a la dosis mayor utilizada reducía de manera significativa los niveles de esta proteína.

Anteriormente se ha mencionado que los polifenoles pueden ejercer sus efectos beneficiosos a través de la activación de sirtuínas. En este sentido, existe un único estudio que ha demostrado que el efecto protector del resveratrol en una colitis inducida por DSS era debido a mecanismos relacionados con un aumento en los niveles de SIRT1 en el colon (Singh y col., 2010). Con el objetivo de profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares por los que el extracto de hoja de mango ejercía su efecto beneficioso en la colitis experimental, hemos evaluado los cambios de expresión de SIRT1 y pAMPK. Nuestros resultados mostraron por primera vez un aumento en la expresión de ambas enzimas tras la administración de un extracto de hoja de mango en animales con colitis aguda y apoyan los datos *in vitro* que habían mostrado mayores niveles de SIRT1 en células HT-20 y THP-1 tratadas con el extracto polifenólico. Estos hallazgos sugieren que la regulación de la actividad de sirtuínas por polifenoles presentes en la dieta podría constituir una estrategia terapéutica prometedora para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la CU.

Con el fin de profundizar en el estudio de los efectos de los polifenoles como reguladores de sirtuínas, se realizaron nuevos ensayos con el nematodo *Caenorhabditis elegans*. Este organismo es un modelo muy extendido en la investigación genética y la biología del desarrollo. Existe un alto grado de conservación entre *C. elegans* y mamíferos en los procesos que controlan el desarrollo, la neurobiología y las respuestas al estrés (Kaletta y Hengartner, 2006). Este nematodo posee un ciclo de vida rápido y bien caracterizado y se puede cultivar en placas de Petri o en placas de múltiples pocillos, haciéndolo susceptible para el *screening* de sustancias con interés

farmacológico. Por estas razones, varias compañías farmacéuticas llevan algunos años empleando *C. elegans* como parte de su proceso de descubrimiento de fármacos (Artal-Sanz y col., 2006, O'Reilly y col., 2014). Actualmente, este organismo se está empleando para múltiples fines entre los que se encuentran la búsqueda de compuestos con actividad antienviejimiento (Lapierre y Hansen, 2012, Zheng y col., 2014) o el uso como modelo de enfermedades neurodegenerativas (Alexander y col., 2014) o de sustancias contra el cáncer (Kobet y col., 2014).

En los estudios farmacológicos resulta fundamental abordar cuestiones relacionadas con las concentraciones de los compuestos a ensayar. Los experimentos con el gusano pueden realizarse tanto en placas de agar NGM como en medio líquido (Lewis y Fleming, 1995). Todos nuestros ensayos se realizaron en placas de agar con la concentración final indicada en cada caso tanto en el agar como en la solución con la bacteria *E. coli*. La solubilidad de los compuestos a ensayar es un factor clave. En múltiples ocasiones es necesario el empleo de disolventes como el DMSO, el cual es un solvente aprótico y altamente polar y por tanto, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos. Sin embargo, la cantidad de DMSO presente en el medio debe estar controlada, ya que en primer lugar, puede tener efectos tóxicos y en segundo lugar, porque se han descrito efectos en la longevidad del nematodo. En este sentido, concentraciones inferiores al 1% no tienen efectos en el desarrollo ni en la reproducción del gusano (Boyd y col., 2010). Sin embargo, otro estudio realizado en placas NGM para valorar el efecto del DMSO a distintas concentraciones sobre la longevidad mostró que concentraciones superiores al 0.5% incrementaron la longevidad. Es reseñable que el incremento de la longevidad era dependiente de sir2.1 (Wang y col., 2010). En medio líquido se han observado resultados similares, ya que cantidades de entorno al 1% de DMSO incrementaron un 20% la longevidad del nematodo (Frankowski y col., 2013). En nuestro estudio, empleamos concentraciones inferiores al 0.1% de DMSO tanto en la placa de agar como en la solución bacteriana, descartando así los posibles efectos del disolvente sobre las cepas empleadas.

Las primeras aproximaciones con *C. elegans* en nuestro estudio se realizaron empleando un mutante para el gen *ire-1*, que presentaba un mayor acúmulo de triglicéridos, y valorando el efecto de la metformina sobre esta cepa. La proteína IRE-1 está involucrada en la respuesta a proteínas desplegadas (Lee y col., 2002, Patil y Walter, 2001), así como también regula la expresión de las lipasas inducidas por el ayuno FIL-1 y FIL-2, las cuales inducen la hidrólisis de gránulos de grasa en situaciones de ayuno (Jo y col., 2009). La metformina es un fármaco antidiabético del tipo biguanida, empleado fundamentalmente en el tratamiento y la prevención de la diabetes mellitus tipo 2. Este fármaco ha mostrado una amplia gama de efectos beneficiosos para la salud mediante la reducción de los riesgos asociados con el síndrome metabólico (Eckel y col., 2005). Además, se le han descrito otros beneficios como la protección frente a agentes nefrotóxicos (Rafieian-Kopaei y Nasri, 2013), o contra algunos cánceres como el de próstata (Li y col., 2009) o el de colon (Ben Sahra y col., 2010). Sin embargo, el mecanismo de acción aún se desconoce, constituyendo un tema de

amplio debate en la actualidad. En mamíferos, estaba aceptado que la metformina actuaba a través de AMPK (Zhou y col., 2001, Ouyang y col., 2011), pero existen publicaciones recientes que señalan otros mecanismos independientes de esta cinasa (Ben Sahra y col., 2011, Foretz y col., 2010).

En *C. elegans* la metformina ha mostrado incrementar la longevidad (Onken y Driscoll, 2010), si bien es cierto que parece que no lo consigue directamente si no a través de alteraciones en el metabolismo del folato y la metionina de las bacterias *E. coli* (Cabreiro y col., 2013). Además, se ha sugerido que la metformina imita al estado de restricción dietética (Ingram y col., 2006), donde la reducción de calorías provoca determinadas respuestas fisiológicas. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con metformina (100 mM) provocó la pérdida de triglicéridos en la cepa *ire-1*. Este adelgazamiento de los gusanos obesos se consiguió, en parte, por el incremento en la expresión de las lipasas FIL-1 y FIL-2 tras la administración de metformina. Asimismo, comprobamos que las sirtuínas tienen un papel todavía más crucial en este proceso, ya que la expresión de *sir2.1* (ARNm) aumentaba con el tratamiento con metformina en todas las cepas empleadas (N2 e *ire-1*). Este efecto de la metformina sobre las sirtuínas ya ha sido descrito en estudios previos (Caton y col., 2010, Arunachalam y col., 2014). Cabe destacar que el incremento en los niveles de sirtuínas resultó ser independiente de *aak2* (homólogo a AMPK). La participación de las sirtuínas en el efecto adelgazante de la metformina quedó finalmente demostrada tras cuantificar el acúmulo de triglicéridos en un mutante *sir2.1*. Los resultados confirmaron que en esta cepa no se vio reducida la cantidad de triglicéridos tras el tratamiento con metformina.

Dada la importancia de las sirtuínas en el efecto adelgazante de la metformina, el interés se centró ahora en valorar si el resveratrol mimetizaba estos efectos. Se seleccionó este polifenol por ser el activador de sirtuínas más clásico descrito en la literatura. Nuestros resultados confirmaron que el resveratrol (100 μ M) imitaba los efectos de la metformina en la cepa N2, consiguiendo reducir el contenido de triglicéridos, y como cabía esperar, estos efectos desaparecían en la cepa *sir2.1*. En ratones ya se ha descrito el efecto del resveratrol en la reducción de peso y de triglicéridos (Xie y col., 2013, Montero y col., 2014).

Numerosos estudios han atribuido a los polifenoles naturales propiedades antienvjecimiento en varios modelos animales, es el caso de los polifenoles del arándano (Wilson y col., 2006), las teaflavinas del té negro (Peng y col., 2009), las procianidinas de manzana (Sunagawa y col., 2011), la curcumina (Liao y col., 2011), el epigallocatequin galato (Abbas y Wink, 2010) y el resveratrol (Bass y col., 2007, Zarse y col., 2010). En muchos de los trabajos se cita a las sirtuínas como responsables del efecto observado; sin embargo, el incremento de la longevidad mediante la sobreexpresión de sirtuínas en *C. elegans* está muy discutido actualmente a raíz de una publicación de Burnett y colaboradores donde señalaban errores en la selección de los mutantes que sobreexpresaban sirtuínas, produciéndose más mutaciones no controladas (Burnett y col., 2011).

Conocido ya el papel beneficioso del extracto de hojas de mango en el modelo de colitis aguda inducida por DSS, nos planteamos finalmente ensayar el efecto del mismo sobre la longevidad del nematodo. Nuestros ensayos confirmaron que el extracto de hojas de mango (50 y 200 $\mu\text{g/mL}$) incrementó ligeramente los días de vida del nematodo y logró que los gusanos aumentaran la vida media en un día, sobre todo a la concentración mayor ensayada. Estos efectos no se repitieron en la cepa *sir2.1*, sugiriendo de nuevo el efecto del extracto sobre las sirtuínas.

Se ha descrito que la restricción calórica extiende la vida en una amplia gama de especies, entre ellas *C. elegans* (Kenyon, 2010). Según la Teoría del soma desechable (Kirkwood, 1977), la cantidad de energía disponible para un organismo se distribuye en tres grandes bloques: mantenimiento, crecimiento y reproducción. El consumo adicional de energía necesario para incrementar la vida debe causar un desequilibrio con consecuencias, por ejemplo, en el tamaño corporal o la cantidad de descendencia. Existen numerosas evidencias que apoyan esta teoría en organismos como *C. elegans* (Saul y col., 2009, Liao y col., 2011), *Drosophila melanogaster* (Nielsen y col., 2008) o incluso en ratón (Brown-Borg y col., 1996, Coschigano y col., 2000, Miller y col., 2000). Nuestras últimas investigaciones avanzaron en este sentido y tuvieron como objetivo analizar si el ligero incremento de vida observado en el nematodo afectaba a parámetros relacionados con el tamaño corporal. Comprobamos que los gusanos N2 crecidos en presencia del extracto de mango presentaron, al sexto día de adulto, un menor tamaño corporal, mientras que la cepa *sir2.1* no vio afectado su tamaño. Para evaluar si la exposición al extracto de hojas de mango podría reducir la ingesta de alimento, lo que daría lugar a un incremento de la longevidad directamente relacionado con la restricción calórica, se cuantificó la frecuencia del bombeo faríngeo. Nuestros resultados confirmaron que el extracto redujo la tasa de bombeo en la cepa silvestre, pero no fue así en la cepa *sir2.1*. Por tanto, estos hallazgos sugieren que el efecto del extracto sobre la longevidad podría estar relacionado con la reducción del tamaño y de la ingesta de alimento y que este efecto implicaría a las sirtuínas. Estos resultados están en la línea de lo encontrado en publicaciones previas que han ensayado otros polifenoles como la curcumina (Liao y col., 2011), donde igualmente observaban una reducción del tamaño y del bombeo faríngeo del nematodo que daba lugar a un incremento de la longevidad. Nuestra aportación novedosa incluiría la participación de sirtuínas en este proceso.

En base a todo lo expuesto, los polifenoles son un grupo muy complejo de compuestos que presentan gran cantidad de propiedades muy interesantes para el tratamiento de diversas enfermedades entre las que se encuentran las de índole inflamatoria. La capacidad demostrada de activar sirtuínas abre un nuevo abanico en sus posibilidades como productos naturales beneficiosos para la salud dada las implicaciones de estas enzimas en procesos tan dispares como la inflamación o el envejecimiento.

CONCLUSIONES

1. Los polifenoles resveratrol y quercetina, así como los extractos de hoja de mango y de hoja de uva, ambos ricos en polifenoles, incrementan la expresión de sirtuínas en la línea de leucemia monocitaria aguda THP-1 y en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano HT-29.
2. Todos los polifenoles y extractos ensayados muestran una potente actividad anti-inflamatoria *in vitro*, generando una inhibición significativa de la producción de la citocina TNF- α , en macrófagos THP-1, con respuestas dosis dependiente. Además, ninguno de los productos estudiados posee actividad citotóxica sobre las líneas THP-1 y HT-29.
3. El estudio con ratones deficientes en interleucina 10 muestra que la enfermedad inflamatoria se inicia en la sexta semana de edad y las lesiones displásicas se desarrollan a partir de las 10 semanas, hallándose cierta correlación entre la gravedad de la displasia y el proceso inflamatorio previo, tal como los hallazgos macroscópicos e histológicos, así como el estudio de localización del antígeno nuclear de proliferación celular demuestran.
4. Siguiendo este modelo, y en relación a los cambios en la expresión de sirtuína 1, los datos obtenidos muestran que en estos animales deficientes en interleucina 10, la inflamación se desarrolla en unas condiciones caracterizadas por una marcada reducción en los niveles de sirtuína 1. Asimismo, se ha demostrado una activación de la autofagia en estos animales, evidenciada por el incremento en las proteínas LC3-II y Beclin 1 y la disminución de los niveles de Bcl-2. Esta activación del proceso autofágico puede ser debida al incremento de la actividad de AMPK observada en los animales IL-10^{-/-}.
5. El tratamiento con resveratrol o un extracto de hojas de mango reduce la severidad de la inflamación en ratones con colitis aguda producida por dextrano sulfato sódico. Las respuestas antiinflamatorias están relacionadas con el descenso del infiltrado de neutrófilos, la disminución de la producción de las citocinas factor de necrosis tumoral-alfa e interleucina 6 y la reducción de la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2. Igualmente, se ha observado un aumento en la expresión de SIRT1 y en la activación de la cinasa AMPK tras la administración aguda de los polifenoles.
6. En *Caenorhabditis elegans*, el resveratrol reduce el contenido de triglicéridos en los gusanos N2. La participación de sirtuínas en este proceso ha quedado demostrada, ya que el efecto adelgazante del resveratrol desaparece en el mutante *sir2.1*.
7. El tratamiento con el extracto de hojas de mango consigue incrementar la esperanza de vida del nematodo en la cepa N2, a través de la reducción del tamaño corporal y de la frecuencia del bombeo faríngeo. En estas acciones

estarían implicados mecanismos sirtuína dependientes, ya que estos efectos se revierten en el mutante *sir2.1*.

CONCLUSIONS

1. The polyphenols resveratrol and quercetin as well as the mango leaf and grape leaf extracts, both rich in polyphenols, increase sirtuin 1 expression in the human acute leukemia monocytic cell line THP-1 and the human adenocarcinoma colon cell line HT-29.
2. All of the polyphenols and extracts tested show a potent anti-inflammatory activity *in vitro*, resulting in a significant inhibition of TNF- α production in THP-1 macrophages, in a dose-dependent manner. Furthermore, none of the products studied possess cytotoxic activity on THP-1 and HT-29 cell lines.
3. The study with interleukin-10-deficient mice shows that the inflammatory disease is present since the sixth week of age and dysplastic lesions develop from 10 weeks. There is a positive correlation between the severity of dysplasia and the inflammatory process, as shown by macroscopic and histological findings, as well as by localization of the proliferating cell nuclear antigen.
4. Following this model of interleukin-10-deficient mice, and regarding sirtuin 1 expression, data show that, in these animals, inflammation develops in conditions characterized by a marked reduction in sirtuin 1 levels. It has also been shown an activation of the autophagy in these animals, as evidenced by the increase in LC3-II and Beclin 1 proteins and the decrease in Bcl-2 colonic levels. This activation of autophagic process may be due to increase in AMPK activity observed in IL-10^{-/-} animals.
5. Treatment with resveratrol or the mango leaf extract reduces the severity of inflammation in mice with acute colitis induced by dextran sodium sulfate; the anti-inflammatory responses seem to be related to the decrease of neutrophil infiltration and tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production, as well as the reduced expression of the enzyme cyclooxygenase-2. Moreover, an increase in SIRT1 expression and AMPK activation has been detected after acute administration of polyphenols.
6. In *Caenorhabditis elegans*, resveratrol reduces the content of triglycerides in N2 worms. The role of sirtuins in this process has been demonstrated, since the anti-obesity effect of resveratrol disappears in the *sir2.1* mutant.
7. Treatment with the mango leaf extract increases the lifespan of the nematode in the N2 strain, through reduced body size and pharyngeal pumping frequency. In these actions may be involved sirtuin-dependent mechanisms, since these effects disappear in the *sir2.1* mutant.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas S Wink M. Epigallocatechin gallate inhibits beta amyloid oligomerization in *Caenorhabditis elegans* and affects the daf-2/insulin-like signaling pathway. *Phytomedicine*. 2010; 17:902-909.

Abraham C Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N.Engl.J.Med*. 2009; 361:2066-2078.

Adlercreutz H Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann.Med*. 1997; 29:95-120.

Adolphe JL, Whiting SJ, Juurlink BH, Thorpe LU Alcorn J. Health effects with consumption of the flax lignan secoisolariciresinol diglucoside. *Br.J.Nutr*. 2010; 103:929-938.

Agatonovic-Kustrin S, Hettiarachchi CG, Morton DW Razic S. Analysis of phenolics in wine by high performance thin-layer chromatography with gradient elution and high resolution plate imaging. *J.Pharm.Biomed.Anal*. 2015; 102:93-99.

Ahmadi A, Polyak S Draganov PV. Colorectal cancer surveillance in inflammatory bowel disease: the search continues. *World J.Gastroenterol*. 2009; 15:61-66.

Alberts DS, Martinez ME, Hess LM, Einspahr JG, Green SB, Bhattacharyya AK, Guillen J, Krutzsch M, Batta AK, Salen G, Fales L, Koonce K, Parish D, Clouser M, Roe D, Lance P Phoenix and Tucson Gastroenterologist Networks. Phase III trial of ursodeoxycholic acid to prevent colorectal adenoma recurrence. *J.Natl.Cancer Inst*. 2005; 97:846-853.

Alexander AG, Marfil V Li C. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front.Genet*. 2014; 5:279.

Al-Halabi R, Bou Chedid M, Abou Merhi R, El-Hajj H, Zahr H, Schneider-Stock R, Bazarbachi A Gali-Muhtasib H. Gallotannin inhibits NFkB signaling and growth of human colon cancer xenografts. *Cancer.Biol.Ther*. 2011; 12:59-68.

Ali T, Madhoun MF, Orr WC Rubin DT. Assessment of the relationship between quality of sleep and disease activity in inflammatory bowel disease patients. *Inflamm.Bowel Dis*. 2013; 19:2440-2443.

Amrouche-Mekkioui I Djerdjouri B. N-acetylcysteine improves redox status, mitochondrial dysfunction, mucin-depleted crypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium-induced oxidative colitis in mice. *Eur.J.Pharmacol*. 2012; 691:209-217.

Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.Hepatol.(N.Y)*. 2013; 9:367-374.

Anderson P. Mutagenesis. *Methods Cell Biol*. 1995; 48:31-58.

Araujo JR, Goncalves P Martel F. Chemopreventive effect of dietary polyphenols in colorectal cancer cell lines. *Nutr.Res*. 2011; 31:77-87.

Bibliografia

Ardizzone S, Puttini PS, Cassinotti A Porro GB. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Dig.Liver Dis.* 2008; 40 Suppl 2:S253-9.

Artal-Sanz M, de Jong L Tavernarakis N. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. *Biotechnol.J.* 2006; 1:1405-1418.

Arts IC, Jacobs DR,Jr, Gross M, Harnack LJ Folsom AR. Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control.* 2002; 13:373-382.

Arts IC, Hollman PC, Bueno De Mesquita HB, Feskens EJ Kromhout D. Dietary catechins and epithelial cancer incidence: the Zutphen elderly study. *Int.J.Cancer.* 2001; 92:298-302.

Arts IC, van De Putte B Hollman PC. Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit juices, and chocolate milk. *J.Agric.Food Chem.* 2000; 48:1752-1757.

Arunachalam G, Samuel SM, Marei I, Ding H Triggle CR. Metformin modulates hyperglycaemia-induced endothelial senescence and apoptosis through SIRT1. *Br.J.Pharmacol.* 2014; 171:523-535.

Asakura H, Suzuki K, Kitahora T Morizane T. Is there a link between food and intestinal microbes and the occurrence of Crohn's disease and ulcerative colitis? *J.Gastroenterol.Hepatol.* 2008; 23:1794-1801.

Asensi M, Ortega A, Mena S, Feddi F Estrela JM. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit.Rev.Clin.Lab.Sci.* 2011; 48:197-216.

Ashrafi K. Obesity and the regulation of fat metabolism. *WormBook.* 2007;1-20.

Aujnarain A, Mack DR Benchimol EI. The role of the environment in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *Curr.Gastroenterol.Rep.* 2013; 15:326-013-0326-4.

Bass TM, Weinkove D, Houthoofd K, Gems D Partridge L. Effects of resveratrol on lifespan in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Mech.Ageing Dev.* 2007; 128:546-552.

Bates EA, Victor M, Jones AK, Shi Y Hart AC. Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to huntingtin polyglutamine toxicity. *J.Neurosci.* 2006; 26:2830-2838.

Baur JA Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2006; 5:493-506.

Beher D, Wu J, Cumine S, Kim KW, Lu SC, Atangan L Wang M. Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity. *Chem.Biol.Drug Des.* 2009; 74:619-624.

- Bemis JE, Vu CB, Xie R, Nunes JJ, Ng PY, Disch JS, Milne JC, Carney DP, Lynch AV, Jin L, Smith JJ, Lavu S, Iffland A, Jirousek MR, Perini RB. Discovery of oxazolo[4,5-b]pyridines and related heterocyclic analogs as novel SIRT1 activators. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* 2009; 19:2350-2353.
- Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S, Bost F. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* 2011; 71:4366-4372.
- Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol.Cancer.Ther.* 2010; 9:1092-1099.
- Bertin B, Dubuquoy L, Colombel JF, Desreumaux P. PPAR-gamma in ulcerative colitis: a novel target for intervention. *Curr.Drug Targets.* 2013; 14:1501-1507.
- Binsack R, Boersma BJ, Patel RP, Kirk M, White CR, Darley-Usmar V, Barnes S, Zhou F, Parks DA. Enhanced antioxidant activity after chlorination of quercetin by hypochlorous acid. *Alcohol.Clin.Exp.Res.* 2001; 25:434-443.
- Bizat N, Peyrin JM, Haik S, Cochois V, Beaudry P, Laplanche JL, Neri C. Neuron dysfunction is induced by prion protein with an insertional mutation via a Fyn kinase and reversed by sirtuin activation in *Caenorhabditis elegans*. *J.Neurosci.* 2010; 30:5394-5403.
- Bjarnason I, Hayllar J, MacPherson AJ, Russell AS. Side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the small and large intestine in humans. *Gastroenterology.* 1993; 104:1832-1847.
- Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. *Nutr.Rev.* 2014; 72:429-452.
- Bordeianou L, Maguire L. State-of-the-art surgical approaches to the treatment of medically refractory ulcerative colitis. *J.Gastrointest.Surg.* 2013; 17:2013-2019.
- Bosani M, Ardizzone S, Porro GB. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Biologics.* 2009; 3:77-97.
- Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat.Rev.Immunol.* 2003; 3:521-533.
- Boyd WA, McBride SJ, Rice JR, Snyder DW, Freedman JH. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 2010; 245:153-159.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 1976; 72:248-254.
- Bradley PP, Christensen RD, Rothstein G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood.* 1982; 60:618-622.

Brimnes J, Allez M, Dotan I, Shao L, Nakazawa A Mayer L. Defects in CD8+ regulatory T cells in the lamina propria of patients with inflammatory bowel disease. *J.Immunol.* 2005; 174:5814-5822.

Brown-Borg HM, Borg KE, Meliska CJ Bartke A. Dwarf mice and the ageing process. *Nature.* 1996; 384:33.

Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A, Kaeberlein M, Soti C, Partridge L Gems D. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature.* 2011; 477:482-485.

Burnett C, Valentini S, Cabreiro F, Goss M, Somogyvari M, Piper MD, Hoddinott M, Sutphin GL, Leko V, McElwee JJ, Vazquez-Manrique RP, Orfila AM, Ackerman D, Au C, Vinti G, Riesen M, Howard K, Neri C, Bedalov A, Kaeberlein M, Soti C, Partridge L Gems D. Absence of effects of Sir2 overexpression on lifespan in *C. elegans* and *Drosophila*. *Nature.* 2011; 477:482-485.

Byerly L, Scherer S Russell RL. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. II. A simplified method for mutant characterization. *Dev.Biol.* 1976; 51:34-48.

Cabreiro F, Au C, Leung KY, Vergara-Irigaray N, Cocheme HM, Noori T, Weinkove D, Schuster E, Greene ND Gems D. Metformin retards aging in *C. elegans* by altering microbial folate and methionine metabolism. *Cell.* 2013; 153:228-239.

Cabrini L, Barzanti V, Cipollone M, Fiorentini D, Grossi G, Tolomelli B, Zambonin L Landi L. Antioxidants and total peroxy radical-trapping ability of olive and seed oils. *J.Agric.Food Chem.* 2001; 49:6026-6032.

Cadwell K, Patel KK, Maloney NS, Liu TC, Ng AC, Storer CE, Head RD, Xavier R, Stappenbeck TS Virgin HW. Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene *Atg16L1* phenotypes in intestine. *Cell.* 2010; 141:1135-1145.

Calder PC. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? *Br.J.Clin.Pharmacol.* 2013; 75:645-662.

Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Pelegri C, Vilaplana J, Beas-Zarate C Pallas M. Sirtuin activators: designing molecules to extend life span. *Biochim.Biophys.Acta.* 2010; 1799:740-749.

Camins A, Sureda FX, Junyent F, Verdaguer E, Folch J, Pelegri C, Vilaplana J, Beas-Zarate C Pallas M. Sirtuin activators: designing molecules to extend life span. *Biochim.Biophys.Acta.* 2010; 1799:740-749.

Campos FG, Logullo Waitzberg AG, Kiss DR, Waitzberg DL, Habr-Gama A Gama-Rodrigues J. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutr.Hosp.* 2005; 20:18-25.

Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*. 2009; 458:1056-1060.

Cassada RC Russell RL. The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev.Biol.* 1975; 46:326-342.

Cassinotti A Travis S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. *Inflamm.Bowel Dis.* 2009; 15:1264-1275.

Caton PW, Nayuni NK, Kieswich J, Khan NQ, Yaqoob MM Corder R. Metformin suppresses hepatic gluconeogenesis through induction of SIRT1 and GCN5. *J.Endocrinol.* 2010; 205:97-106.

Cavanaugh J. NOD2: ethnic and geographic differences. *World J.Gastroenterol.* 2006; 12:3673-3677.

Chandrasekara A Shahidi F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. *J.Agric.Food Chem.* 2010; 58:6706-6714.

Chen LF, Mu Y Greene WC. Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *EMBO J.* 2002; 21:6539-6548.

Chen W, Rezaizadehnajafi L Wink M. Influence of resveratrol on oxidative stress resistance and life span in *Caenorhabditis elegans*. *J.Pharm.Pharmacol.* 2013; 65:682-688.

Cheung ZH Ip NY. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. *J.Neurochem.* 2011; 118:317-325.

Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch.Biochem.Biophys.* 2010; 501:79-90.

Chung S, Yao H, Caito S, Hwang JW, Arunachalam G Rahman I. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch.Biochem.Biophys.* 2010; 501:79-90.

Clifford MN, Wu W, Kirkpatrick J Kuhnert N. Profiling the chlorogenic acids and other caffeic acid derivatives of herbal chrysanthemum by LC-MSn. *J.Agric.Food Chem.* 2007; 55:929-936.

Colgate EC, Miranda CL, Stevens JF, Bray TM Ho E. Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer Lett.* 2007; 246:201-209.

Coombes JL, Robinson NJ, Maloy KJ, Uhlig HH Powrie F. Regulatory T cells and intestinal homeostasis. *Immunol.Rev.* 2005; 204:184-194.

Coppede F, Lopomo A, Spisni R, Migliore L. Genetic and epigenetic biomarkers for diagnosis, prognosis and treatment of colorectal cancer. *World J.Gastroenterol.* 2014; 20:943-956.

Cortell JM, Kennedy JA. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) pinot noir fruit and extraction in a model system. *J.Agric.Food Chem.* 2006; 54:8510-8520.

Coschigano KT, Clemmons D, Bellush LL, Kopchick JJ. Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology.* 2000; 141:2608-2613.

Coulibaly AY, Kiendrebeogo M, Kehoe PG, Sombie PA, Lamien CE, Millogo JF, Nacoulma OG. Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. *J.Med.Food.* 2011; 14:1576-1582.

Covas MI, Miro-Casas E, Fito M, Farre-Albadalejo M, Gimeno E, Marrugat J, De La Torre R. Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans. *Drugs Exp.Clin.Res.* 2003; 29:203-206.

Cucchiara S, Stronati L, Aloï M. Interactions between intestinal microbiota and innate immune system in pediatric inflammatory bowel disease. *J.Clin.Gastroenterol.* 2012; 46 Suppl:S64-6.

Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 2004; 14:70-77.

Cui X, Jin Y, Hofseth AB, Pena E, Habiger J, Chumanevich A, Poudyal D, Nagarkatti M, Nagarkatti PS, Singh UP, Hofseth LJ. Resveratrol suppresses colitis and colon cancer associated with colitis. *Cancer.Prev.Res.(Phila).* 2010; 3:549-559.

Cypser JR, Kitzenberg D, Park SK. Dietary restriction in *C. elegans*: recent advances. *Exp.Gerontol.* 2013; 48:1014-1017.

D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J.Exp.Med.* 1993; 178:1041-1048.

Dang DT, Chen F, Gardner LB, Cummins JM, Rago C, Bunz F, Kantsevoy SV, Dang LH. Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res.* 2006; 66:1684-1936.

D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann.Ist.Super.Sanita.* 2007; 43:348-361.

Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD, Davis B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 2009; 296:R1071-7.

de Boer VC, de Goffau MC, Arts IC, Hollman PC Keijer J. SIRT1 stimulation by polyphenols is affected by their stability and metabolism. *Mech.Ageing Dev.* 2006; 127:618-627.

de Bono M. Molecular approaches to aggregation behavior and social attachment. *J.Neurobiol.* 2003; 54:78-92.

de Kok TM, van Breda SG Manson MM. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. *Eur.J.Nutr.* 2008; 47 Suppl 2:51-59.

de Roest RH, Dobbs BR, Chapman BA, Batman B, O'Brien LA, Leeper JA, Hebblethwaite CR Geary RB. The low FODMAP diet improves gastrointestinal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: a prospective study. *Int.J.Clin.Pract.* 2013; 67:895-903.

De Simone C, Sollena P, Coco V Caldarola G. Psoriasis and erythema nodosum: two comorbidities of inflammatory bowel diseases. *G.Ital.Dermatol.Venereol.* 2013; 148:175-184.

Delmas D, Lancon A, Colin D, Jannin B Latruffe N. Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising molecule for fighting cancer. *Curr.Drug Targets.* 2006; 7:423-442.

Deutschmann A, Schlagenhaut A, Leschnik B, Hoffmann KM, Hauer A Muntean W. Increased procoagulant function of microparticles in pediatric inflammatory bowel disease: role in increased thrombin generation. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* 2013; 56:401-407.

Dou W, Zhang J, Ren G, Ding L, Sun A, Deng C, Wu X, Wei X, Mani S Wang Z. Mangiferin attenuates the symptoms of dextran sulfate sodium-induced colitis in mice via NF-kappaB and MAPK signaling inactivation. *Int.Immunopharmacol.* 2014; 23:170-178.

Dovizio M, Alberti S, Guillem-Llobat P Patrignani P. Role of platelets in inflammation and cancer: novel therapeutic strategies. *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.* 2014; 114:118-127.

Dryden GW, Song M McClain C. Polyphenols and gastrointestinal diseases. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2006; 22:165-170.

Eaden JA, Abrams KR Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001; 48:526-535.

Eckel RH, Grundy SM Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet.* 2005; 365:1415-1428.

Eisen B, Ungar Y Shimoni E. Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *J.Agric.Food Chem.* 2003; 51:2212-2215.

Eisener-Dorman AF, Lawrence DA Bolivar VJ. Cautionary insights on knockout mouse studies: the gene or not the gene? *Brain Behav.Immun.* 2009; 23:318-324.

Eri RD, Adams RJ, Tran TV, Tong H, Das I, Roche DK, Oancea I, Png CW, Jeffery PL, Radford-Smith GL, Cook MC, Florin TH McGuckin MA. An intestinal epithelial defect conferring ER stress results in inflammation involving both innate and adaptive immunity. *Mucosal Immunol.* 2011; 4:354-364.

Fellermann K, Stange DE, Schaeffeler E, Schmalzl H, Wehkamp J, Bevins CL, Reinisch W, Teml A, Schwab M, Lichter P, Radlwimmer B Stange EF. A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am.J.Hum.Genet.* 2006; 79:439-448.

Fenercioglu AK, Saler T, Genc E, Sabuncu H Altuntas Y. The effects of polyphenol-containing antioxidants on oxidative stress and lipid peroxidation in Type 2 diabetes mellitus without complications. *J.Endocrinol.Invest.* 2010; 33:118-124.

Fimia GM Piacentini M. Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell Mol.Life Sci.* 2010; 67:1581-1588.

Fini L, Hotchkiss E, Fogliano V, Graziani G, Romano M, De Vol EB, Qin H, Selgrad M, Boland CR Ricciardiello L. Chemopreventive properties of pinoselin-rich olive oil involve a selective activation of the ATM-p53 cascade in colon cancer cell lines. *Carcinogenesis.* 2008; 29:139-146.

Finkel T, Deng CX Mostoslavsky R. Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. *Nature.* 2009; 460:587-591.

Firestein R, Blander G, Michan S, Oberdoerffer P, Ogino S, Campbell J, Bhimavarapu A, Luikenhuis S, de Cabo R, Fuchs C, Hahn WC, Guarente LP Sinclair DA. The SIRT1 deacetylase suppresses intestinal tumorigenesis and colon cancer growth. *PLoS One.* 2008; 3:e2020.

Fisher MD, Watson C, Fox KM, Chen YW Gandra SR. Dosing patterns of three tumor necrosis factor blockers among patients with rheumatoid arthritis in a large United States managed care population. *Curr.Med.Res.Opin.* 2013; 29:561-568.

Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J.Clin.Invest.* 2010; 120:2355-2369.

Franchimont D, Vermeire S, El Housni H, Pierik M, Van Steen K, Gustot T, Quertinmont E, Abramowicz M, Van Gossum A, Deviere J Rutgeerts P. Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut.* 2004; 53:987-992.

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2007; 104:13780-13785.

Franke A, Balschun T, Karlsen TH, Sventoraityte J, Nikolaus S, Mayr G, Domingues FS, Albrecht M, Nothnagel M, Ellinghaus D, Sina C, Onnie CM, Weersma RK, Stokkers PC, Wijmenga C, Gazouli M, Strachan D, McArdle WL, Vermeire S, Rutgeerts P, Rosenstiel P, Krawczak M, Vatn MH, IBSEN study group, Mathew CG, Schreiber S. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat.Genet.* 2008; 40:1319-1323.

Frankowski H, Alavez S, Spilman P, Mark KA, Nelson JD, Mollahan P, Rao RV, Chen SF, Lithgow GJ, Ellerby HM. Dimethyl sulfoxide and dimethyl formamide increase lifespan of *C. elegans* in liquid. *Mech.Ageing Dev.* 2013; 134:69-78.

Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2000; 273:793-798.

Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Dev.Cell.* 2008; 14:661-673.

Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol.* 2010; 20:355-362.

Garcia R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. High intake of specific carotenoids and flavonoids does not reduce the risk of bladder cancer. *Nutr.Cancer.* 1999; 35:212-214.

Garcia-Maurino S, Alcaide A, Dominguez C. Pharmacological control of autophagy: therapeutic perspectives in inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *Curr.Pharm.Des.* 2012; 18:3853-3873.

Gardlik R, Palffy R, Celec P. Recombinant probiotic therapy in experimental colitis in mice. *Folia Biol.(Praha).* 2012; 58:238-245.

Geier MS, Butler RN, Giffard PM, Howarth GS. Prebiotic and synbiotic fructooligosaccharide administration fails to reduce the severity of experimental colitis in rats. *Dis.Colon Rectum.* 2007; 50:1061-1069.

Geier MS, Butler RN, Howarth GS. Inflammatory bowel disease: current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int.J.Food Microbiol.* 2007; 115:1-11.

Gems D, Riddle DL. Defining wild-type life span in *Caenorhabditis elegans*. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 2000; 55:B215-9.

Geremia A, Biancheri P, Allan P, Corazza GR, Di Sabatino A. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmun.Rev.* 2014; 13:3-10.

Ghosh N, Chaki R, Mandal SC. Inhibition of selective adhesion molecules in treatment of inflammatory bowel disease. *Int.Rev.Immunol.* 2012; 31:410-427.

Gibson PR Shepherd SJ. Personal view: food for thought--western lifestyle and susceptibility to Crohn's disease. The FODMAP hypothesis. *Aliment.Pharmacol.Ther.* 2005; 21:1399-1409.

Girlich C Scholmerich J. Topical delivery of steroids in inflammatory bowel disease. *Curr.Drug Deliv.* 2012; 9:345-349.

Gonthier MP, Cheynier V, Donovan JL, Manach C, Morand C, Mila I, Lapiere C, Remesy C Scalbert A. Microbial aromatic acid metabolites formed in the gut account for a major fraction of the polyphenols excreted in urine of rats fed red wine polyphenols. *J.Nutr.* 2003; 133:461-467.

Gordon JN, Di Sabatino A Macdonald TT. The pathophysiologic rationale for biological therapies in inflammatory bowel disease. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2005; 21:431-437.

Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. *Semin.Immunopathol.* 2013; 35:229-244.

Guha S, Natarajan O, Murbach CG, Dinh J, Wilson EC, Cao M, Zou S Dong Y. Supplement timing of cranberry extract plays a key role in promoting *Caenorhabditis elegans* healthspan. *Nutrients.* 2014; 6:911-921.

Guo W, Kong E Meydani M. Dietary polyphenols, inflammation, and cancer. *Nutr.Cancer.* 2009; 61:807-810.

Habeeb BS, Kitayama J Nagawa H. Adiponectin supports cell survival in glucose deprivation through enhancement of autophagic response in colorectal cancer cells. *Cancer.Sci.* 2011; 102:999-1006.

Hansen D Pilgrim D. Sex and the single worm: sex determination in the nematode *C. elegans*. *Mech.Dev.* 1999; 83:3-15.

Harborne JB Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000; 55:481-504.

Hart AL, Al-Hassi HO, Rigby RJ, Bell SJ, Emmanuel AV, Knight SC, Kamm MA Stagg AJ. Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2005; 129:50-65.

Hashimoto T, Horikawa M, Nomura T Sakamoto K. Nicotinamide adenine dinucleotide extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* mediated by sir-2.1 and daf-16. *Biogerontology.* 2010; 11:31-43.

Hasnat MA, Pervin M, Cha KM, Kim SK Lim BO. Anti inflammatory activity on mice of extract of *Ganoderma lucidum* grown on rice via modulation of MAPK and NF-kappaB pathways. *Phytochemistry.* 2014;

Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, Price GR, Tauro SB, Taupin D, Thornton DJ, Png CW, Crockford TL, Cornall RJ, Adams R, Kato M, Nelms KA, Hong NA, Florin TH,

Goodnow CC McGuckin MA. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS Med.* 2008; 5:e54.

Hedin C, Whelan K Lindsay JO. Evidence for the use of probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease: a review of clinical trials. *Proc.Nutr.Soc.* 2007; 66:307-315.

Henning SM, Wang P, Carpenter CL Heber D. Epigenetic effects of green tea polyphenols in cancer. *Epigenomics.* 2013; 5:729-741.

Hibi T, Ogata H Sakuraba A. Animal models of inflammatory bowel disease. *J.Gastroenterol.* 2002; 37:409-417.

Higuchi LM, Khalili H, Chan AT, Richter JM, Bousvaros A Fuchs CS. A prospective study of cigarette smoking and the risk of inflammatory bowel disease in women. *Am.J.Gastroenterol.* 2012; 107:1399-1406.

Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, Stimac D, Vucelic B, Lonovics J, Zakuciova M, D'Haens G, Van Assche G, Ba S, Lee S Pearce T. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut.* 2006; 55:1131-1137.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature.* 2003; 425:191-196.

Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A Murphy KM. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.* 1993; 260:547-549.

Hsiung YC, Liu JJ, Hou YC, Yeh CL Yeh SL. Effects of dietary glutamine on the homeostasis of CD4+ T cells in mice with dextran sulfate sodium-induced acute colitis. *PLoS One.* 2014; 9:e84410.

Hu ML. Dietary polyphenols as antioxidants and anticancer agents: more questions than answers. *Chang Gung Med.J.* 2011; 34:449-460.

Huang WP Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct.Funct.* 2002; 27:409-420.

Hubner RA Houlston RS. Folate and colorectal cancer prevention. *Br.J.Cancer.* 2009; 100:233-239.

Huett A, Goel G Xavier RJ. A systems biology viewpoint on autophagy in health and disease. *Curr.Opin.Gastroenterol.* 2010; 26:302-309.

Huibregtse IL, van Lent AU van Deventer SJ. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? *Gut.* 2007; 56:584-592.

Ierardi E, Principi M, Francavilla R, Passaro S, Noviello F, Burattini O, Francavilla A. Epithelial proliferation and ras p21 oncoprotein expression in rectal mucosa of patients with ulcerative colitis. *Dig.Dis.Sci.* 2001; 46:1083-1087.

Ingram DK, Zhu M, Mamczarz J, Zou S, Lane MA, Roth GS, deCabo R. Calorie restriction mimetics: an emerging research field. *Aging Cell.* 2006; 5:97-108.

Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat.Cell Biol.* 2002; 4:648-657.

Inoue J, Nishiumi S, Fujishima Y, Masuda A, Shiomi H, Yamamoto K, Nishida M, Azuma T, Yoshida M. Autophagy in the intestinal epithelium regulates *Citrobacter rodentium* infection. *Arch.Biochem.Biophys.* 2012; 521:95-101.

Iwama T. NSAIDs and colorectal cancer prevention. *J.Gastroenterol.* 2009; 44 Suppl 19:72-76.

Jain M, Parmar HS. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. *Inflamm.Res.* 2011; 60:483-491.

Jang SH, Min KW, Paik SS, Jang KS. Loss of SIRT1 histone deacetylase expression associates with tumour progression in colorectal adenocarcinoma. *J.Clin.Pathol.* 2012; 65:735-739.

Jantchou P, Morois S, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F. Animal protein intake and risk of inflammatory bowel disease: The E3N prospective study. *Am.J.Gastroenterol.* 2010; 105:2195-2201.

Jeong JJ, Jang SE, Hyam SR, Han MJ, Kim DH. Mangiferin ameliorates colitis by inhibiting IRAK1 phosphorylation in NF-kappaB and MAPK pathways. *Eur.J.Pharmacol.* 2014; 740:652-661.

Jo H, Shim J, Lee JH, Lee J, Kim JB. IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in *C. elegans*. *Cell.Metab.* 2009; 9:440-448.

Jo H, Shim J, Lee JH, Lee J, Kim JB. IRE-1 and HSP-4 contribute to energy homeostasis via fasting-induced lipases in *C. elegans*. *Cell.Metab.* 2009; 9:440-448.

Johnson IT. Anticarcinogenic effects of diet-related apoptosis in the colorectal mucosa. *Food Chem.Toxicol.* 2002; 40:1171-1178.

Jorgensen EM, Mango SE. The art and design of genetic screens: *caenorhabditis elegans*. *Nat.Rev.Genet.* 2002; 3:356-369.

Ju J, Lu G, Lambert JD, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Semin.Cancer Biol.* 2007; 17:395-402.

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol.Biol.Cell.* 2009; 20:1992-2003.

Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat.Rev.Drug Discov.* 2006; 5:387-398.

Kanneganti M, Mino-Kenudson M, Mizoguchi E. Animal models of colitis-associated carcinogenesis. *J.Biomed.Biotechnol.* 2011; 2011:342637.

Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu.Rev.Immunol.* 2010; 28:573-621.

Kato K, Ogura T, Kishimoto A, Minegishi Y, Nakajima N, Miyazaki M, Esumi H. Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation. *Oncogene.* 2002; 21:6082-6090.

Kenyon C. A pathway that links reproductive status to lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2010; 1204:156-162.

Kenyon C. The nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 1988; 240:1448-1453.

Key TJ, Sharp GB, Appleby PN, Beral V, Goodman MT, Soda M, Mabuchi K. Soy foods and breast cancer risk: a prospective study in Hiroshima and Nagasaki, Japan. *Br.J.Cancer.* 1999; 81:1248-1256.

Kim J, Klionsky DJ. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu.Rev.Biochem.* 2000; 69:303-342.

Kirkwood TB. Evolution of ageing. *Nature.* 1977; 270:301-304.

Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, Agrawal DK, Aliev G, Askew DS, Baba M, Baehrecke EH, Bahr BA, Ballabio A, Bamber BA, Bassham DC, Bergamini E, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Bredesen DE, Brodsky JL, Brumell JH, Brunk UT, Bursch W, Camougrand N, Cebollero E, Cecconi F, Chen Y, Chin LS, Choi A, Chu CT, Chung J, Clarke PG, Clark RS, Clarke SG, Clave C, Cleveland JL, Codogno P, Colombo MI, Coto-Montes A, Cregg JM, Cuervo AM, Debnath J, Demarchi F, Dennis PB, Dennis PA, Deretic V, Devenish RJ, Di Sano F, Dice JF, Difiglia M, Dinesh-Kumar S, Distelhorst CW, Djavaheri-Mergny M, Dorsey FC, Droge W, Dron M, Dunn WA, Jr, Duszenko M, Eissa NT, Elazar Z, Esclatine A, Eskelinen EL, Fesus L, Finley KD, Fuentes JM, Fueyo J, Fujisaki K, Galliot B, Gao FB, Gewirtz DA, Gibson SB, Gohla A, Goldberg AL, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gorski S, Gottlieb RA, Haussinger D, He YW, Heidenreich K, Hill JA, Hoyer-Hansen M. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 2008; 4:151-175.

Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev.Cell.* 2003; 5:539-545.

Knekt P, Jarvinen R, Seppanen R, Hellovaara M, Teppo L, Pukkala E, Aromaa A. Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms. *Am.J.Epidemiol.* 1997; 146:223-230.

Kobet RA, Pan X, Zhang B, Pak SC, Asch AS, Lee MH. : A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and Therapeutic Target Identification. *Biomol.Ther.(Seoul).* 2014; 22:371-383.

Koelink PJ, Overbeek SA, Braber S, de Kruijf P, Folkerts G, Smit MJ, Kraneveld AD. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review. *Pharmacol.Ther.* 2012; 133:1-18.

Kohno H, Suzuki R, Yasui Y, Miyamoto S, Wakabayashi K, Tanaka T. Ursodeoxycholic acid versus sulfasalazine in colitis-related colon carcinogenesis in mice. *Clin.Cancer Res.* 2007; 13:2519-2525.

Kolacek M, Muchova J, Vrankova S, Jendekova L, Pechanova O, Ulicna O, Watala C, Durackova Z. Effect of natural polyphenols, pycnogenol(R) on superoxide dismutase and nitric oxide synthase in diabetic rats. *Prague Med.Rep.* 2010; 111:279-288.

Kriegl L, Vieth M, Kirchner T, Menssen A. Up-regulation of c-MYC and SIRT1 expression correlates with malignant transformation in the serrated route to colorectal cancer. *Oncotarget.* 2012; 3:1182-1193.

Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell.* 1993; 75:263-274.

Kumar A, Chaudhary T, Mishra J. Minocycline modulates neuroprotective effect of hesperidin against quinolinic acid induced Huntington's disease like symptoms in rats: behavioral, biochemical, cellular and histological evidences. *Eur.J.Pharmacol.* 2013; 720:16-28.

Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J.Biol.Chem.* 2008; 283:27628-27635.

Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J.Biol.Chem.* 2008; 283:27628-27635.

Lapierre LR, Hansen M. Lessons from *C. elegans*: signaling pathways for longevity. *Trends Endocrinol.Metab.* 2012; 23:637-644.

Lee CS, McNamara D, O'Morain CA. Aspirin as a chemoprevention agent for colorectal cancer. *Curr.Drug Metab.* 2012; 13:1313-1322.

Lee IH, Cao L, Mostoslavsky R, Lombard DB, Liu J, Bruns NE, Tsokos M, Alt FW, Finkel T. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 2008; 105:3374-3379.

Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002; 16:452-466.

Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F. Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J.Leukoc.Biol.* 2004; 75:1156-1165.

Lemann M, Mary JY, Duclos B, Veyrac M, Dupas JL, Delchier JC, Laharie D, Moreau J, Cadiot G, Picon L, Bourreille A, Sobahni I, Colombel JF Groupe d'Etude Therapeutique des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). Infliximab plus azathioprine for steroid-dependent Crohn's disease patients: a randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology.* 2006; 130:1054-1061.

Leong DJ, Choudhury M, Hanstein R, Hirsh DM, Kim S, Majeska RJ, Schaffler MB, Hardin JA, Spray DC, Goldring MB, Cobelli NJ, Sun HB. Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse post-traumatic osteoarthritis model. *Arthritis Res. Ther.* 2014; 16:508.

Lewis JA, Fleming JT. Basic culture methods. *Methods Cell Biol.* 1995; 48:3-29.

Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2009; 137:482-488.

Liao VH, Yu CW, Chu YJ, Li WH, Hsieh YC, Wang TT. Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech.Ageing Dev.* 2011; 132:480-487.

Lin Z, Hegarty JP, John G, Berg A, Wang Z, Sehgal R, Pastor DM, Wang Y, Harris LR, 3rd, Poritz LS, Schreiber S, Koltun WA. NOD2 mutations affect muramyl dipeptide stimulation of human B lymphocytes and interact with other IBD-associated genes. *Dig.Dis.Sci.* 2013; 58:2599-2607.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods.* 2001; 25:402-408.

Lopez A, Peyrin-Biroulet L. 5-Aminosalicylic acid and chemoprevention: does it work? *Dig.Dis.* 2013; 31:248-253.

Lopez-Lazaro M. Hypoxia-inducible factor 1 as a possible target for cancer chemoprevention. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2006; 15:2332-2335.

Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol.Cancer.Res.* 2006; 4:221-233.

Lu J, Ho CT, Ghai G, Chen KY. Differential effects of theaflavin monogallates on cell growth, apoptosis, and Cox-2 gene expression in cancerous versus normal cells. *Cancer Res.* 2000; 60:6465-6471.

Bibliografia

Maggiori L Panis Y. Laparoscopy in Crohn's disease. *Best Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* 2014; 28:183-194.

Magrone T Jirillo E. The interplay between the gut immune system and microbiota in health and disease: nutraceutical intervention for restoring intestinal homeostasis. *Curr.Pharm.Des.* 2013; 19:1329-1342.

Mair W, Panowski SH, Shaw RJ Dillin A. Optimizing dietary restriction for genetic epistasis analysis and gene discovery in *C. elegans*. *PLoS One.* 2009; 4:e4535.

Maltzman JS Koretzky GA. Azathioprine: old drug, new actions. *J.Clin.Invest.* 2003; 111:1122-1124.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am.J.Clin.Nutr.* 2004; 79:727-747.

Mannon PJ, Fuss IJ, Mayer L, Elson CO, Sandborn WJ, Present D, Dolin B, Goodman N, Groden C, Hornung RL, Quezado M, Yang Z, Neurath MF, Salfeld J, Veldman GM, Schwertschlag U, Strober W Anti-IL-12 Crohn's Disease Study Group. Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease. *N.Engl.J.Med.* 2004; 351:2069-2079.

Manson MM. Cancer prevention -- the potential for diet to modulate molecular signalling. *Trends Mol.Med.* 2003; 9:11-18.

Marquez L, Perez-Nievas BG, Garate I, Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Menchen L, Garrido G Leza JC. Anti-inflammatory effects of *Mangifera indica* L. extract in a model of colitis. *World J.Gastroenterol.* 2010; 16:4922-4931.

Marshall JK, Thabane M, Steinhart AH, Newman JR, Anand A Irvine EJ. Rectal 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst.Rev.* 2010; (1):CD004115. doi:CD004115.

Marshall JK Irvine EJ. Putting rectal 5-aminosalicylic acid in its place: the role in distal ulcerative colitis. *Am.J.Gastroenterol.* 2000; 95:1628-1636.

Matula S, Croog V, Itzkowitz S, Harpaz N, Bodian C, Hossain S Ullman T. Chemoprevention of colorectal neoplasia in ulcerative colitis: the effect of 6-mercaptopurine. *Clin.Gastroenterol.Hepatol.* 2005; 3:1015-1021.

Mellini P, Valente S Mai A. Sirtuin modulators: an updated patent review (2012 - 2014). *Expert Opin.Ther.Pat.* 2014;1-11.

Michan S Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem.J.* 2007; 404:1-13.

Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am.J.Gastroenterol.* 2009; 104:437-443.

Miller RA, Chrisp C Atchley W. Differential longevity in mouse stocks selected for early life growth trajectory. *J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci.* 2000; 55:B455-61.

Minty A, Ferrara P Caput D. Interleukin-13 effects on activated monocytes lead to novel cytokine secretion profiles intermediate between those induced by interleukin-10 and by interferon-gamma. *Eur.Cytokine Netw.* 1997; 8:189-201.

Miro-Casas E, Covas MI, Fito M, Farre-Albadalejo M, Marrugat J de la Torre R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur.J.Clin.Nutr.* 2003; 57:186-190.

Montero M, de la Fuente S, Fonteriz RI, Moreno A Alvarez J. Effects of long-term feeding of the polyphenols resveratrol and kaempferol in obese mice. *PLoS One.* 2014; 9:e112825.

Morselli E, Maiuri MC, Markaki M, Megalou E, Pasparaki A, Palikaras K, Criollo A, Galluzzi L, Malik SA, Vitale I, Michaud M, Madeo F, Tavernarakis N Kroemer G. The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy. *Autophagy.* 2010; 6:186-188.

Morselli E, Galluzzi L, Kepp O, Vicencio JM, Criollo A, Maiuri MC Kroemer G. Anti- and pro-tumor functions of autophagy. *Biochim.Biophys.Acta.* 2009; 1793:1524-1532.

Mosli MH Feagan BG. Vedolizumab for Crohn's disease. *Expert Opin.Biol.Ther.* 2013; 13:455-463.

Motilva V, Talero E, Calvo JR, Villegas I, Alarcon-de-la-Lastra C Sanchez-Fidalgo S. Intestinal immunomodulation. Role of regulative peptides and promising pharmacological activities. *Curr.Pharm.Des.* 2008; 14:71-95.

Mouchiroud L, Molin L, Kasturi P, Triba MN, Dumas ME, Wilson MC, Halestrap AP, Roussel D, Masse I, Dalliere N, Segalat L, Billaud M Solari F. Pyruvate imbalance mediates metabolic reprogramming and mimics lifespan extension by dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 2011; 10:39-54.

Muise AM, Walters TD, Glowacka WK, Griffiths AM, Ngan BY, Lan H, Xu W, Silverberg MS Rotin D. Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut.* 2009; 58:1121-1127.

Murrow L Debnath J. Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu.Rev.Pathol.* 2013; 8:105-137.

Nanda K Moss AC. Update on the management of ulcerative colitis: treatment and maintenance approaches focused on MMX((R)) mesalamine. *Clin.Pharmacol.* 2012; 4:41-50.

Ng K, Meyerhardt JA, Chan AT, Sato K, Chan JA, Niedzwiecki D, Saltz LB, Mayer RJ, Benson AB,3rd, Schaefer PL, Whittom R, Hantel A, Goldberg RM, Venook AP, Ogino S, Giovannucci EL Fuchs CS. Aspirin and COX-2 Inhibitor Use in Patients With Stage III Colon Cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* 2014; 107:10.1093/jnci/dju345. Print 2015 Jan.

Nguyen GC. Tip of the iceberg? The emergence of antibiotic-resistant organisms in the IBD population. *Gut Microbes*. 2012; 3:434-436.

Nielsen MD, Luo X, Biteau B, Syverson K Jasper H. 14-3-3 Epsilon antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*. *Aging Cell*. 2008; 7:688-699.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am.J.Clin.Nutr*. 2001; 74:418-425.

Nunes T, Barreiro-de Acosta M, Marin-Jimenez I, Nos P Sans M. Oral locally active steroids in inflammatory bowel disease. *J.Crohns Colitis*. 2013; 7:183-191.

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001; 411:603-606.

Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J.Gastroenterol.Hepatol*. 2002; 17:1078-1083.

Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J Ohkusa T. Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J.Gastroenterol.Hepatol*. 2002; 17:1078-1083.

Oliva J, French BA, Li J, Bardag-Gorce F, Fu P French SW. Sirt1 is involved in energy metabolism: the role of chronic ethanol feeding and resveratrol. *Exp.Mol.Pathol*. 2008; 85:155-159.

Onizawa M, Nagaishi T, Kanai T, Nagano K, Oshima S, Nemoto Y, Yoshioka A, Totsuka T, Okamoto R, Nakamura T, Sakamoto N, Tsuchiya K, Aoki K, Ohya K, Yagita H Watanabe M. Signaling pathway via TNF-alpha/NF-kappaB in intestinal epithelial cells may be directly involved in colitis-associated carcinogenesis. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol*. 2009; 296:G850-9.

Onken B Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One*. 2010; 5:e8758.

O'Reilly LP, Luke CJ, Perlmutter DH, Silverman GA Pak SC. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. *Adv.Drug Deliv.Rev*. 2014; 69-70:247-253.

Orgaard A Jensen L. The effects of soy isoflavones on obesity. *Exp.Biol.Med.(Maywood)*. 2008; 233:1066-1080.

Ou HC, Chou FP, Sheen HM, Lin TM, Yang CH Huey-Herng Sheu W. Resveratrol, a polyphenolic compound in red wine, protects against oxidized LDL-induced cytotoxicity in endothelial cells. *Clin.Chim.Acta*. 2006; 364:196-204.

Ouyang J, Parakhia RA Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J.Biol.Chem.* 2011; 286:1-11.

Ouyang W, Kolls JK Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 2008; 28:454-467.

Owen RW, Mier W, Giacosa A, Hull WE, Spiegelhalder B Bartsch H. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food Chem.Toxicol.* 2000; 38:647-659.

Pacholec M, Bleasdale JE, Chrnyk B, Cunningham D, Flynn D, Garofalo RS, Griffith D, Griffior M, Loulakis P, Pabst B, Qiu X, Stockman B, Thanabal V, Varghese A, Ward J, Withka J Ahn K. SRT1720, SRT2183, SRT1460, and resveratrol are not direct activators of SIRT1. *J.Biol.Chem.* 2010; 285:8340-8351.

Palaniappan S, Ford AC, Greer D, Everett SM, Chalmers DM, Axon AT Hamlin PJ. Mycophenolate mofetil therapy for refractory inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2007; 13:1488-1492.

Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R Iranshahi M. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother.Res.* 2014;

Park CE, Kim MJ, Lee JH, Min BI, Bae H, Choe W, Kim SS Ha J. Resveratrol stimulates glucose transport in C2C12 myotubes by activating AMP-activated protein kinase. *Exp.Mol.Med.* 2007; 39:222-229.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, Fisher SA, Roberts RG, Nimmo ER, Cummings FR, Soars D, Drummond H, Lees CW, Khawaja SA, Bagnall R, Burke DA, Todhunter CE, Ahmad T, Onnie CM, McArdle W, Strachan D, Bethel G, Bryan C, Lewis CM, Deloukas P, Forbes A, Sanderson J, Jewell DP, Satsangi J, Mansfield JC, Wellcome Trust Case Control Consortium, Cardon L Mathew CG. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat.Genet.* 2007; 39:830-832.

Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT Yeh ET. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation.* 2001; 103:2531-2534.

Patel KV, Farrant P, Sanderson JD Irving PM. Hair loss in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2013; 19:1753-1763.

Patil C Walter P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2001; 13:349-355.

Pelteková VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH Siminovitch KA.

Bibliografia

Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat.Genet.* 2004; 36:471-475.

Peng C, Chan HY, Li YM, Huang Y, Chen ZY. Black tea theaflavins extend the lifespan of fruit flies. *Exp.Gerontol.* 2009; 44:773-783.

Perse M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J.Biomed.Biotechnol.* 2012; 2012:718617.

Pezzuto JM, Kondratyuk TP, Ogas T. Resveratrol derivatives: a patent review (2009 - 2012). *Expert Opin.Ther.Pat.* 2013; 23:1529-1546.

Plavsic I, Stimac T, Hauser G. Crohn's disease in women. *Int.J.Womens Health.* 2013; 5:681-688.

Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T, Kagaya T, Kaneko S, Oshima M, Fujii C, Mukaida N. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J.Clin.Invest.* 2008; 118:560-570.

Powell JJ, Thoree V, Pele LC. Dietary microparticles and their impact on tolerance and immune responsiveness of the gastrointestinal tract. *Br.J.Nutr.* 2007; 98 Suppl 1:S59-63.

Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G. Statins and the risk of colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 2005; 352:2184-2192.

Pruitt K, Zinn RL, Ohm JE, McGarvey KM, Kang SH, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB. Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet.* 2006; 2:e40.

Quinones M, Miguel M, Alexandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol.Res.* 2013; 68:125-131.

Rafieian-Kopaei M, Nasri H. Ginger and diabetic nephropathy. *J.Renal Inj.Prev.* 2013; 2:9-10.

Ramakers JD, Verstege MI, Thuijls G, Te Velde AA, Mensink RP, Plat J. The PPARgamma agonist rosiglitazone impairs colonic inflammation in mice with experimental colitis. *J.Clin.Immunol.* 2007; 27:275-283.

Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol.Nutr.Food Res.* 2008; 52:507-526.

Ramos S. Cancer chemoprevention and chemotherapy: dietary polyphenols and signalling pathways. *Mol.Nutr.Food Res.* 2008; 52:507-526.

Ran ZH, Chen C, Xiao SD. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates rats colitis induced by acetic acid. *Biomed.Pharmacother.* 2008; 62:189-196.

Rankin CH. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nat.Rev.Genet.* 2002; 3:622-630.

Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K Poulsen L. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Mol.Nutr.Food Res.* 2005; 49:159-174.

Rastall RA. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu.Rev.Food Sci.Technol.* 2010; 1:305-339.

Renna S, Orlando A Cottone M. Randomized controlled trials in perianal Crohn's disease. *Rev.Recent.Clin.Trials.* 2012; 7:297-302.

Reuter S, Eifes S, Dicato M, Aggarwal BB Diederich M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. *Biochem.Pharmacol.* 2008; 76:1340-1351.

Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, Ahren C, Correa P, Hamilton SR Morson BC. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum.Pathol.* 1983; 14:931-968.

Rigottier-Gois L. Dysbiosis in inflammatory bowel diseases: the oxygen hypothesis. *ISME J.* 2013; 7:1256-1261.

Rios LY, Gonthier MP, Remesy C, Mila I, Lapierre C, Lazarus SA, Williamson G Scalbert A. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *Am.J.Clin.Nutr.* 2003; 77:912-918.

Risitano R, Curro M, Cirmi S, Ferlazzo N, Campiglia P, Caccamo D, Ientile R Navarra M. Flavonoid fraction of Bergamot juice reduces LPS-induced inflammatory response through SIRT1-mediated NF-kappaB inhibition in THP-1 monocytes. *PLoS One.* 2014; 9:e107431.

Roberts H, Rai SN, Pan J, Rao JM, Keskey RC, Kanaan Z, Short EP, Mottern E Galandiuk S. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease and the influence of smoking. *Digestion.* 2014; 90:122-129.

Roncarolo MG, Battaglia M Gregori S. The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J.Autoimmun.* 2003; 20:269-272.

ROSENQVIST H, OHRLING H, LAGERCRANTZ R EDLING N. Ulcerative colitis and carcinoma coli. *Lancet.* 1959; 1:906-908.

Rothwell JA, Medina-Reyon A, Perez-Jimenez J, Neveu V, Knaze V, Slimani N Scalbert A. Effects of food processing on polyphenol contents: A systematic analysis using Phenol-Explorer data. *Mol.Nutr.Food Res.* 2014;

Rousseaux C, El-Jamal N, Fumery M, Dubuquoy C, Romano O, Chatelain D, Langlois A, Bertin B, Buob D, Colombel JF, Cortot A, Desreumaux P Dubuquoy L. The 5-

aminosalicylic acid antineoplastic effect in the intestine is mediated by PPARgamma. *Carcinogenesis*. 2013; 34:2580-2586.

Rubin DT, Cruz-Correa MR, Gasche C, Jass JR, Lichtenstein GR, Montgomery EA, Riddell RH, Rutter MD, Ullman TA, Velayos FS, Itzkowitz S 5-ASA in Colorectal Cancer Prevention Meeting Group. Colorectal cancer prevention in inflammatory bowel disease and the role of 5-aminosalicylic acid: a clinical review and update. *Inflamm.Bowel Dis*. 2008; 14:265-274.

Rupp C, Mummelthei A, Sauer P, Weiss KH, Schirmacher P, Stiehl A, Stremmel W, Gotthardt DN. Non-IBD immunological diseases are a risk factor for reduced survival in PSC. *Liver Int*. 2013; 33:86-93.

Rutgeerts P. Current dilemmas in the management of inflammatory bowel disease. *Eur.J.Surg.Suppl*. 2002; (587):58-61.

Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, Tanaka K, Kawai T, Tsujimura T, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature*. 2008; 456:264-268.

Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*. 2014; 8:122-146.

Sak K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacogn Rev*. 2014; 8:122-146.

Sakamoto N, Kono S, Wakai K, Fukuda Y, Satomi M, Shimoyama T, Inaba Y, Miyake Y, Sasaki S, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Yokoyama T, Date C, Tanaka H Epidemiology Group of the Research Committee on Inflammatory Bowel Disease in Japan. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan. *Inflamm.Bowel Dis*. 2005; 11:154-163.

Salaga M, Lewandowska U, Sosnowska D, Zakrzewski PK, Cygankiewicz AI, Piechota-Polanczyk A, Sobczak M, Mosinska P, Chen C, Krajewska WM, Fichna J. Polyphenol extract from evening primrose pomace alleviates experimental colitis after intracolonic and oral administration in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol*. 2014; 387:1069-1078.

Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, Rosillo MA, Aparicio-Soto M de la Lastra CA. Dietary squalene supplementation improves DSS-induced acute colitis by downregulating p38 MAPK and NFkB signaling pathways. *Mol.Nutr.Food Res*. 2014;

Sanchez-Fidalgo S, Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M de la Lastra CA. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *J.Nutr.Biochem*. 2013; 24:1401-1413.

Sanchez-Fidalgo S, Cardeno A, Sanchez-Hidalgo M, Aparicio-Soto M de la Lastra CA. Dietary extra virgin olive oil polyphenols supplementation modulates DSS-induced chronic colitis in mice. *J.Nutr.Biochem*. 2013; 24:1401-1413.

- Sans M. Probiotics for inflammatory bowel disease: a critical appraisal. *Dig.Dis.* 2009; 27 Suppl 1:111-114.
- Sarkar FH Li Y. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy. *Front.Biosci.* 2008; 13:2950-2959.
- Saul N, Pietsch K, Sturzenbaum SR, Menzel R Steinberg CE. Diversity of polyphenol action in *Caenorhabditis elegans*: between toxicity and longevity. *J.Nat.Prod.* 2011; 74:1713-1720.
- Saul N, Pietsch K, Menzel R, Sturzenbaum SR Steinberg CE. Catechin induced longevity in *C. elegans*: from key regulator genes to disposable soma. *Mech.Ageing Dev.* 2009; 130:477-486.
- Scalbert A Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J.Nutr.* 2000; 130:2073S-85S.
- Schultz M, Munro K, Tannock GW, Melchner I, Gottl C, Schwietz H, Scholmerich J Rath HC. Effects of feeding a probiotic preparation (SIM) containing inulin on the severity of colitis and on the composition of the intestinal microflora in HLA-B27 transgenic rats. *Clin.Diagn.Lab.Immunol.* 2004; 11:581-587.
- Serriari NE, Eoche M, Lamotte L, Lion J, Fumery M, Marcelo P, Chatelain D, Barre A, Nguyen-Khac E, Lantz O, Dupas JL Treiner E. Innate mucosal-associated invariant T (MAIT) cells are activated in inflammatory bowel diseases. *Clin.Exp.Immunol.* 2014; 176:266-274.
- Sewell JL Velayos FS. Systematic review: The role of race and socioeconomic factors on IBD healthcare delivery and effectiveness. *Inflamm.Bowel Dis.* 2013; 19:627-643.
- Shanahan F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflamm.Bowel Dis.* 2004; 10 Suppl 1:S16-24.
- Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol.(Oxf).* 2009; 196:65-80.
- Shen Z, Ajmo JM, Rogers CQ, Liang X, Le L, Murr MM, Peng Y You M. Role of SIRT1 in regulation of LPS- or two ethanol metabolites-induced TNF-alpha production in cultured macrophage cell lines. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2009; 296:G1047-53.
- Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M Nagarkatti PS. Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2010; 332:829-839.
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S Boyd MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J.Natl.Cancer Inst.* 1990; 82:1107-1112.

Bibliografia

Sobczak M, Fabisiak A, Murawska N, Wesolowska E, Wierzbicka P, Wlazlowski M, Wojcikowska M, Zatorski H, Zwolinska M Fichna J. Current overview of extrinsic and intrinsic factors in etiology and progression of inflammatory bowel diseases. *Pharmacol.Rep.* 2014; 66:766-775.

Soderholm JD Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am.J.Physiol.Gastrointest.Liver Physiol.* 2001; 280:G7-G13.

Soobrattee MA, Bahorun T Aruoma OI. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. *Biofactors.* 2006; 27:19-35.

Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol.* 2012; 12:51-230X-12-51.

Stockinger B, Veldhoen M Martin B. Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin.Immunol.* 2007; 19:353-361.

Sturlan S, Oberhuber G, Beinhauer BG, Tichy B, Kappel S, Wang J Rogy MA. Interleukin-10-deficient mice and inflammatory bowel disease associated cancer development. *Carcinogenesis.* 2001; 22:665-671.

Su LJ Arab L. Tea consumption and the reduced risk of colon cancer -- results from a national prospective cohort study. *Public Health Nutr.* 2002; 5:419-425.

Sun Q, Jia N, Wang W, Jin H, Xu J Hu H. Activation of SIRT1 by curcumin blocks the neurotoxicity of amyloid-beta25-35 in rat cortical neurons. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2014; 448:89-94.

Sunagawa T, Shimizu T, Kanda T, Tagashira M, Sami M Shirasawa T. Procyanidins from apples (*Malus pumila* Mill.) extend the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Planta Med.* 2011; 77:122-127.

Taba Taba Vakili S, Taher M Ebrahimi Daryani N. Update on the management of ulcerative colitis. *Acta Med.Iran.* 2012; 50:363-372.

Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J.Cell Biol.* 1992; 119:301-311.

Tan BS, Kang O, Mai CW, Tiong KH, Khoo AS, Pichika MR, Bradshaw TD Leong CO. 6-Shogaol inhibits breast and colon cancer cell proliferation through activation of peroxisomal proliferator activated receptor gamma (PPARgamma). *Cancer Lett.* 2013; 336:127-139.

Targan SR Karp LC. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol.Rev.* 2005; 206:296-305.

Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, DeWoody KL, Schaible TF Rutgeerts PJ. A short-term study of chimeric monoclonal

antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. N.Engl.J.Med. 1997; 337:1029-1035.

Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, Drillenburger P, van Deventer SJ, Chvatchko Y, Te Velde AA. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. Gastroenterology. 2001; 121:1372-1379.

Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. Inflamm.Bowel Dis. 2011; 17:831-848.

Thun MJ, Henley SJ, Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. Novartis Found.Symp. 2004; 256:6-21; discussion 22-8, 49-52, 266-9.

Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2001; 410:227-230.

Tissenbaum HA, Guarente L. Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. Nature. 2001; 410:227-230.

Triantafyllidis JK, Merikas E, Gikas A. Psychological factors and stress in inflammatory bowel disease. Expert Rev.Gastroenterol.Hepatol. 2013; 7:225-238.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. Nutrients. 2010; 2:1231-1246.

Valls J, Millan S, Martí MP, Borrás E, Arola L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. J.Chromatogr.A. 2009; 1216:7143-7172.

van Roy F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. Nat.Rev.Cancer. 2014; 14:121-134.

Velayos FS, Liu L, Lewis JD, Allison JE, Flowers N, Hutfless S, Abramson O, Perry GS, Herrinton LJ. Prevalence of colorectal cancer surveillance for ulcerative colitis in an integrated health care delivery system. Gastroenterology. 2010; 139:1511-1518.

Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. Curr.Pharm.Des. 2012; 18:3831-3852.

Veres B. Anti-Inflammatory Role of Natural Polyphenols and Their Degradation Products. 2012;

Verma HD, Scherl EJ, Jacob VE, Bosworth BP. Anti-nuclear antibody positivity and the use of certolizumab in inflammatory bowel disease patients who have had arthralgias or lupus-like reactions from infliximab or adalimumab. J.Dig.Dis. 2011; 12:379-383.

Videla S, Vilaseca J, Antolin M, Garcia-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A, Malagelada JR. Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. Am.J.Gastroenterol. 2001; 96:1486-1493.

Volpe MG, De Cunzio F, Siano F, Paolucci M, Barbarisi C Cammarota G. Influence of extraction techniques on physical-chemical characteristics and volatile compounds of extra virgin olive oil. *J.Oleo Sci.* 2014; 63:875-883.

Wang SL, Wang ZR Yang CQ. Meta-analysis of broad-spectrum antibiotic therapy in patients with active inflammatory bowel disease. *Exp.Ther.Med.* 2012; 4:1051-1056.

Wang X, Wang X, Li L Wang D. Lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2010; 400:613-618.

Wang Y, Liang Y Vanhoutte PM. SIRT1 and AMPK in regulating mammalian senescence: a critical review and a working model. *FEBS Lett.* 2011; 585:986-994.

Wang Y Tissenbaum HA. Overlapping and distinct functions for a *Caenorhabditis elegans* SIR2 and DAF-16/FOXO. *Mech.Ageing Dev.* 2006; 127:48-56.

Watson WH, Cai J Jones DP. Diet and apoptosis. *Annu.Rev.Nutr.* 2000; 20:485-505.

Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol.Cell.* 2008; 30:678-688.

Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2000; 60:3823-3831.

Williamson G Carughi A. Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutr.Res.* 2010; 30:511-519.

Wilson MA, Shukitt-Hale B, Kalt W, Ingram DK, Joseph JA Wolkow CA. Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell.* 2006; 5:59-68.

Wirtz S Neurath MF. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2007; 59:1073-1083.

Xie HC, Han HP, Chen Z He JP. A study on the effect of resveratrol on lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Afr.J.Tradit.Complement.Altern.Med.* 2013; 11:209-212.

Xie J, Zhang X Zhang L. Negative regulation of inflammation by SIRT1. *Pharmacol.Res.* 2013; 67:60-67.

Xie J Itzkowitz SH. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J.Gastroenterol.* 2008; 14:378-389.

Yamaguchi R, Hosaka M, Torii S, Hou N, Saito N, Yoshimoto Y, Imai H Takeuchi T. Cyclophilin C-associated protein regulation of phagocytic functions via NFAT activation in macrophages. *Brain Res.* 2011; 1397:55-65.

Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu.Rev.Nutr.* 2001; 21:381-406.

Yang GY, Liao J, Kim K, Yurkow EJ, Yang CS. Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols. *Carcinogenesis.* 1998; 19:611-616.

Yang H, Zhang W, Pan H, Feldser HG, Lainez E, Miller C, Leung S, Zhong Z, Zhao H, Sweitzer S, Considine T, Riera T, Suri V, White B, Ellis JL, Vlasuk GP, Loh C. SIRT1 activators suppress inflammatory responses through promotion of p65 deacetylation and inhibition of NF-kappaB activity. *PLoS One.* 2012; 7:e46364.

Yang SR, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am.J.Physiol.Lung Cell.Mol.Physiol.* 2007; 292:L567-76.

Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2010; 22:124-131.

Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 2009; 335:1-32.

Yoon JH, Baek SJ. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Med.J.* 2005; 46:585-596.

Yoshizaki T, Milne JC, Imamura T, Schenk S, Sonoda N, Babendure JL, Lu JC, Smith JJ, Jirousek MR, Olefsky JM. SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol.Cell.Biol.* 2009; 29:1363-1374.

Zamuner SR, Bak AW, Devchand PR, Wallace JL. Predisposition to colorectal cancer in rats with resolved colitis: role of cyclooxygenase-2-derived prostaglandin d2. *Am.J.Pathol.* 2005; 167:1293-1300.

Zarse K, Schmeisser S, Birringer M, Falk E, Schmol D, Ristow M. Differential effects of resveratrol and SRT1720 on lifespan of adult *Caenorhabditis elegans*. *Horm.Metab.Res.* 2010; 42:837-839.

Zhang R, Chen HZ, Liu JJ, Jia YY, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang Y, Xu J, Wei YS, Liu DP, Liang CC. SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J.Biol.Chem.* 2010; 285:7097-7110.

Zhang R, Chen HZ, Liu JJ, Jia YY, Zhang ZQ, Yang RF, Zhang Y, Xu J, Wei YS, Liu DP, Liang CC. SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J.Biol.Chem.* 2010; 285:7097-7110.

Zheng S, Liao S, Zou Y, Qu Z, Shen W, Shi Y. Mulberry leaf polyphenols delay aging and regulate fat metabolism via the germline signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Age (Dordr).* 2014; 36:9719-014-9719-z. Epub 2014 Oct 17.

Bibliografia

Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J.Clin.Invest.* 2001; 108:1167-1174.